

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Růžena Lišková

STANOVENÍ HEPARINU TECHNIKOU SEKVENČNÍ  
INEJKČNÍ ANALÝZY SE SPEKTROFOTOMETRICKOU  
DETEKČÍ

Determination of Heparin by Sequential Injection Analysis  
with Spectrophotometric Detection

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jakub Hraníček, Ph.D.

Praha 2014

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 29. května 2014

.....  
Růžena Lišková

## Abstrakt

V této práci byla zkoumána metoda stanovení heparinu pomocí fenothiazinových barviv technikou sekvenční injekční analýzy.

Principem tohoto stanovení byla interakce heparinu s fenothiazinovými barviv, která způsobí pokles absorbance na vlnové délce absorpčního maxima těchto barviv. Míra poklesu absorbance je potom úměrná koncentraci heparinu ve vzorku. Cílem práce bylo zjistit, jaké jsou optimální podmínky měření a parametry nastavení přístroje při stanovení heparinu pomocí sekvenční injekční analýzy, a následně vyzkoušet aplikaci této metody na reálné vzorky.

Testována byla tři fenothiazinová barviva: methylenová modř, Azure A a Azure B. Byla zkoumána jejich optimální koncentrace pro SIA stanovení heparinu a byla určena jako  $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  pro methylenovou modř a  $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  pro Azure A a B. Jako optimální nasávaný objem vzorku a reagentu bylo vybráno 150  $\mu\text{l}$ . Průtoková rychlost při záznamu pak byla zvolena 1,5 ml/min a reakční čas 0 s.

Byl nalezen pracovní rozsah koncentrací heparinu pro tuto metodu, a to pro methylenovou modř 0,23 – 15 mg/dm<sup>3</sup>, pro Azure A 1,2 – 13 mg/dm<sup>3</sup> a pro Azure B 0,67 – 12 mg/dm<sup>3</sup>. Limit detekce se pohyboval v rozmezí 0,09 – 0,35 mg/dm<sup>3</sup> a limit stanovení v rozmezí 0,30 – 1,2 mg/dm<sup>3</sup>. Jako míra opakovatelnosti výsledků byla určena relativní směrodatná odchylka stanovení heparinu touto metodou a pohybovala se v rozmezí 1,9 – 4,5 %. Jako nejvhodnější barvivo pro stanovení heparinu touto metodou byla zvolena methylenová modř.

Nalezené optimální parametry byly nakonec aplikovány na stanovení heparinu v reálných vzorcích lidské moči a krevního séra. Přestože se projevil poměrně výrazný vliv interferencí, byly sestrojeny kalibrační křivky stanovení heparinu v těchto matricích.

## Klíčová slova

- Heparin
- Sekvenční injekční analýza
- Fenothiazinová barviva
- Spektrofotometrická detekce

## Abstract

In this work the determination of heparin using Sequential Injection Analysis (SIA) technique with spectrophotometric detection was studied. The principle of this method was measuring the decrease of absorbance of phenothiazine dyes in its maximum wavelength caused by its interaction with heparin. The decrease is proportional to concentration of heparin in sample. The aim of this work was to find optimum conditions for determination of heparin by the SIA with spectrophotometric detection and to try to apply this measurement to real sample under these conditions.

Three phenothiazine dyes were used: Methylene Blue, Azure A and Azure B and for each of them an optimum concentration was found. Their values were for methylene blue  $4.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  and  $5.0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  for Azure A and Azure B. 150  $\mu\text{l}$  was chosen as an optimum amount of heparin and reagent aspirated. Optimum reaction time was 0 s and flow rate during measurement 1.5 ml/min.

Working concentration range was found between 0.23 and 15  $\text{mg/dm}^3$  for methylene blue, 1.2 and 13  $\text{mg/dm}^3$  for Azure A and 0.67 and 12  $\text{mg/dm}^3$  for Azure B. Limit of detection varied between 0.09 – 0.35  $\text{mg/dm}^3$  and limit of quantification between 0.30 and 1.2  $\text{mg/dm}^3$  for different dyes. Relative standard deviation was determined as a measure of repeatability. Its values were 1.8 – 4.5 %. Methylene Blue was chosen as the best dye for determination of heparin by this technique.

In the end the determination was applied to real samples of human blood serum and urine. Interferences of the matrix had some influence and in spite of this calibration curves for determination of heparin in these solutions were created.

## Keywords

- Heparin
- Sequential injection analysis
- Phenothiazine dyes
- Spectrophotometric detection

## Poděkování

Na úvod bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce, panu doktoru Hraníčkovi, za jeho rady a pomoc jak při práci v laboratoři, tak i s výsledným textem. Můj dík patří samozřejmě také mým rodičům za jejich podporu, a to nejen morální. A v neposlední řadě pak mému příteli, Františku Filandrovi, za trpělivost a ochotu se mnou o práci nejednou diskutovat.

# Obsah:

<b>1. Úvod</b>	- 8 -
<b>2. Teoretická část</b>	- 9 -
2.1. <i>Heparin</i>	- 9 -
2.1.1. Struktura heparinu	- 9 -
2.1.2. Funkce a využití	- 9 -
2.1.3. Stanovení heparinu	- 11 -
2.2. <i>Fenothiazinová barviva</i>	- 13 -
2.2.1. Methylenová modř	- 13 -
2.2.2. Azure A	- 14 -
2.2.3. Azure B	- 14 -
2.2.4. Reakce s heparinem	- 15 -
2.3. <i>Průtokové metody analýzy</i>	- 16 -
2.3.1. Segmentová průtoková analýza (SFA)	- 16 -
2.3.2. Průtoková injekční analýza (FIA)	- 17 -
2.3.3. Sekvenční injekční analýza (SIA)	- 18 -
2.3.3.1. Princip a součásti systému	- 18 -
2.3.3.2. Varianty SIA	- 20 -
2.3.3.2.1. SI-LOV	- 20 -
2.3.3.2.2. Bead injection (BI)	- 21 -
2.3.3.3. Výhody a nevýhody SIA	- 22 -
<b>3. Experimentální část</b>	- 23 -
3.1. Použité chemikálie	- 23 -
3.2. Použité přístroje	- 23 -
3.3. Použitá aparatura SIA	- 24 -
3.4. Zpracování dat	- 25 -
<b>4. Výsledky a diskuse</b>	- 27 -
4.1. Absorpční spektra fenothiazinových barviv	- 27 -
4.2. Koncentrace barviv a heparinu pro další měření	- 28 -
4.3. Poměr objemů reagentů a vzorku	- 29 -
4.4. Optimální koncentrace barviv	- 30 -
4.5. Vliv průtokové rychlosti při záznamu na průběh stanovení	- 32 -
4.6. Vliv reakčního času na tvary píků	- 33 -
4.7. Kalibrační závislosti	- 34 -
4.8. Opakovatelnost SIA stanovení heparinu	- 36 -
4.9. Pracovní rozsah stanovení heparinu	- 37 -
4.10. Reálné vzorky	- 38 -
4.10.1. Stanovení koncentrace heparinu v moči	- 38 -
4.10.2. Stanovení koncentrace heparinu v krevním séru	- 40 -
<b>5. Závěr</b>	- 42 -

## Seznam zkratek a symbolů:

<b>ACT</b>	Aktivovaný koagulační čas, způsob stanovení heparinu
<b>APTT</b>	Aktivovaný parciální thromboplastinový čas, způsob stanovení heparinu
<b>HPLC</b>	Vysokotlaká kapalinová chromatografie
<b>UV</b>	Ultrafialová oblast spektra
<b>IU</b>	Mezinárodní jednotka, jednotka aktivity heparinu
<b>FIA</b>	Průtoková injekční analýza
<b>SFA</b>	Segmentová průtoková analýza
<b>SIA</b>	Sekvenční injekční analýza
<b>SI-LOV</b>	Miniaturizovaná sekvenční injekční analýza s ventilem laboratory-on-valve
<b>BI</b>	Bead injection
$\bar{x}$	Aritmetický průměr z hodnot $x_1$ až $x_n$
<b>n</b>	Počet měření
<b>s</b>	Směrodatná odchylka
<b>s<sub>r</sub></b>	Relativní směrodatná odchylka [%]
<b>A</b>	Absorbance
$\lambda$	Vlnová délka [nm]
<b>c</b>	Koncentrace [mol/dm <sup>3</sup> ], [mg/dm <sup>3</sup> ]
<b>F</b>	Průtoková rychlost [μl/s], [ml/min]
<b>t</b>	Čas [s]
<b>ΔA</b>	Rozdíl absorbancí čistého barviva a barviva s heparinem
<b>V<sub>MM</sub></b>	Objem methylenové modři [μl]
<b>V<sub>AA</sub></b>	Objem Azure A [μl]
<b>V<sub>AB</sub></b>	Objem Azure B [μl]

# 1.Úvod

Heparin je často používané léčivo snižující srážlivost krve. Kvůli jeho vedlejším účinkům a možnosti vzniku komplikací je třeba pečlivé dávkování a sledování jeho hladiny v krvi pacienta. Je tedy velmi důležité mít rychlou, levnou a automatizovatelnou metodu jeho stanovení.

V této práci byla ke stanovení heparinu použita metoda SIA se spektrofotometrickou detekcí s využitím interakce heparinu s fenothiazinovými barvivy. Její výhodou je právě automatizace procesu, krátký čas potřebný na provedení analýzy, a také menší spotřeba činidel. Podobným způsobem již byl heparin dříve stanovován pomocí průtokové injekční analýzy (FIA), která je předchůdcem SIA.

Cílem práce bylo určit optimální podmínky stanovení heparinu touto metodou a poté výsledky aplikovat na reálné vzorky lidské moči a krevního séra. Dalším úkolem pak bylo zjištění charakteristik SIA stanovení heparinu, jako je limit detekce, opakovatelnost výsledků nebo pracovní rozsah koncentrací. Porovnávána byla tři různá fenothiazinová barviva, aby bylo možné posoudit, které z nich je pro stanovení heparinu nejvhodnější.



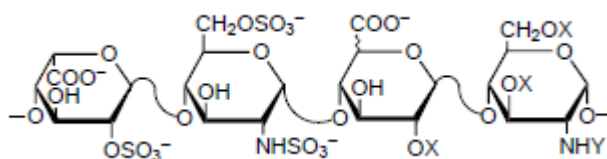
## 2. Teoretická část

### 2.1. Heparin

#### 2.1.1. Struktura heparinu

Heparin je sulfatovaný polysacharid, patřící mezi glykosaminoglykany, který má mnoho různých biologických funkcí<sup>1</sup>. Kvůli jeho schopnosti zvyšovat účinnost inhibice koagulačních faktorů antithrombinem se běžně využívá jako léčivo potlačující srážlivost krve.

Strukturou je heparin heterogenní lineární polymer<sup>1</sup>. Skládá se z disacharidů, které obsahují glukosamin, který je přes svůj 1. uhlík připojen k 4. uhlíku kyseliny L-iduronové nebo kyseliny D-glukuronové (Obr. 2.1.). Průměrně se v řetězci nachází 90 % kyseliny L-iduronové a 10 % kyseliny D-glukuronové. Na každém disacharidu je také průměrně navázáno 2,7 sulfonové skupiny, která může být navázána na jednu z hydroxylových skupin, karboxylovou skupinu nebo aminoskupinu glukosaminu. Aminoskupina může být také acetylována.



Obr. 2.1 Dva disacharidy heparinu – vlevo je příklad nejobvyklejšího disacharidu, vpravo ukázka variability (X = H nebo SO<sup>3-</sup> a Y = H, SO<sup>3-</sup> nebo CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>)<sup>1</sup>.

Primární struktura heparinu je tedy velmi variabilní, což umožňuje jeho selektivní vazbu na mnoho různých proteinů<sup>1</sup>. Díky přítomnosti sulfonových a karboxylových skupin má heparin záporný náboj.

Sekundární strukturou heparinu je  $\alpha$ -helix a terciární strukturu na rozdíl od proteinů netvoří<sup>1</sup>.

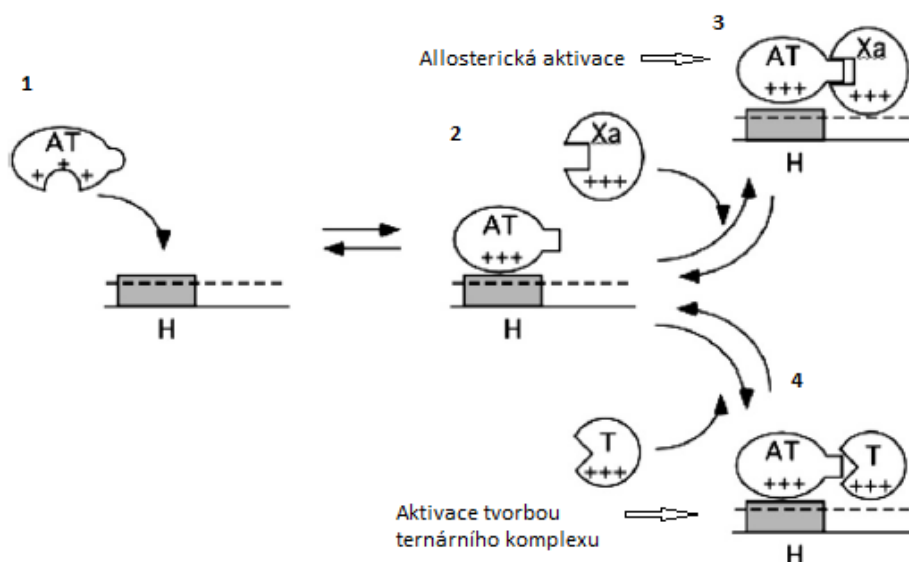
#### 2.1.2. Funkce a využití

V lidském těle se heparin nachází v žírných buňkách, odkud může být vylučován společně s histaminem<sup>2</sup>. V případě poranění dochází v jeho místě k aktivaci srážecích faktorů, které

nakonec způsobí tvorbu krevní sraženiny. Heparin potom slouží k inaktivaci srážecích faktorů uniklých z místa poranění, které by jinak mohly způsobit např. vznik trombózy a ucpání některých cév<sup>3</sup>.

Heparin brání srážení krve tím, že allostericky aktivuje antithrombin, který na sebe váže pomocí specifického pentasacharidu s vysokou afinitou k antithrombinu<sup>3</sup>. Navázání heparinu způsobí konformační změnu v antithrombinu a zvýší tím jeho reaktivitu s koagulačními faktory Xa a IXa.

Zároveň mohou dostatečně dlouhé heparinové řetězce aktivovat antithrombin tak, že na sebe navážou nejen antithrombin, ale i koagulační faktor<sup>3</sup>. Vytvoří se tak ternární komplex, kde heparin drží antithrombin pohromadě se srážecím faktorem a napomáhá tak jejich interakci. Tento způsob je důležitý hlavně proto, že na rozdíl od faktorů Xa a IXa, které se mohou vázat na antithrombin i díky allosterické aktivaci, se další důležitý koagulační faktor, thrombin, váže pouze takto.



Obr. 2.2 Mechanismus aktivace antithrombinu heparinem. AT = antithrombin, H = heparin, T = thrombin, Xa = koagulační faktor Xa<sup>3</sup>

Na obr. 2.2 je zobrazen mechanismus obou způsobů aktivace antithrombinu<sup>3</sup>. V obou případech se nejdříve pozitivně nabitá část antithrombinu naváže na specifický, negativně nabitý, pentasacharid heparinu (1). Tato vazba potom způsobí konformační změnu v místě pro vazbu koagulačních faktorů na antithrombinu (2). Allosterická aktivace zvýší reaktivitu antithrombinu s faktory Xa a IXa, ale reaktivitu thrombinu ovlivní jen

minimálně, protože thrombin s místem pro specifickou vazbu faktorů Xa a IXa neinteraguje (3). Delší heparinové řetězce mohou vázat koagulační faktory také tak, že se jejich pozitivně nabitě části vážou na negativně nabitě místo na heparinu, které je v optimální vzdálenosti od místa vazby antithrombinu. Tak se thrombin dostane do ideální pozice, ve které může interagovat s antithrombinem (4).

Díky své schopnosti snižovat srážlivost krve se tedy heparin využívá v medicíně na léčbu nemocí spojených právě s nadměrným srážením krve, jako jsou žilní trombózy, plicní embolie nebo infarkt myokardu<sup>4</sup>. Dále se využívá při zákrocích, kde je žádoucí zabránit srážení krve, například u operací srdce.

K dalším vlastnostem heparinu potom patří schopnost potlačovat zánět, inhibice funkce aldosteronu, zvýšení aktivity lipoprotein lipasy, snížení schopnosti thyroidních hormonů vázat se na své receptory nebo například i snížení šance tvorby metastáz u nádorových onemocnění<sup>2</sup>.

### **2.1.3. Stanovení heparinu**

Jak už bylo řečeno výše, heparin má v lidském těle mnoho funkcí a při terapeutickém využití je tedy velmi důležité správné dávkování a sledování hladiny heparinu v krvi. Při předávkování heparinem nebo naopak protaminem (využívaným jako protilátka) může totiž dojít k závažným komplikacím<sup>5,6</sup>. Zároveň nacházejí metody pro stanovení heparinu využití také ve výzkumu, například pro zjištění vztahu dávka-efekt při testování nových léčiv<sup>7</sup>.

Ke stanovování heparinu bývají využívány biologické metody jako je ACT (aktivovaný koagulační čas) nebo APTT (aktivovaný parciální thromboplastinový čas), které jsou založeny na sledování rychlosti srážení krve<sup>8</sup>. Protože tato rychlost nezávisí pouze na koncentraci heparinu, ale i dalších faktorech jako je teplota, funkce ostatních koagulačních faktorů, citlivost pacienta k heparinu nebo množství antithrombinu v krvi jednotlivých pacientů, jsou tyto metody málo selektivní a stanovení heparinu tak nemusí být přesné<sup>6,9</sup>.

Z chemických analytických metod bylo pro stanovení heparinu použito HPLC s fluorimetrickou detekcí, kde byl jako pomocná látka využit 2-kyanoacetamid. Touto metodou lze detekovat i malá množství heparinu (řádově pmol), ale před jejím použitím je třeba heparin enzymaticky rozložit a je tedy poměrně časově náročná<sup>10</sup>. Dále bylo popsáno použití kapilární elektroforézy s UV detekcí<sup>11</sup> nebo s bezkontaktní konduktometrickou

detekcí<sup>8</sup>, přičemž výhodou této metody je možnost stanovit nejen koncentraci, ale i rozdíly ve struktuře. Ze separačních metod byla ještě použita například micelární elektrokinetická kapilární chromatografie s UV detekcí, kterou lze stanovit heparin přímo v krvi, pokud je přítomen ve větším množství (nad 80 IU/l)<sup>12</sup>.

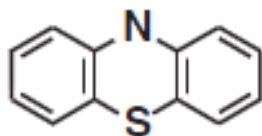
Pro stanovení heparinu byly použity i některé elektrochemické metody jako titrace protaminem s potenciometrickou indikací pomocí elektrody s protamin-selektivní membránou<sup>7</sup>, polarografie s využitím reakce heparinu s malachitovou zelení<sup>13</sup>, cyklická voltametrie s využitím interakce s methylenovou modří<sup>14</sup> nebo stanovení ACT a APTT pomocí piezoelektrického křemenného krystalu, jehož výhodou je možnost rychlé analýzy na místě, například při operaci<sup>15</sup>.

Z metod průtokové analýzy bylo popsáno stanovení heparinu pomocí FIA s elektrochemickou detekcí pomocí elektrody pokryté oxidy mědi a ruthenia<sup>16</sup>, dále pak s detekcí pomocí rezonančního rozptylu světla při interakci s barvivem Azure A<sup>17</sup>, a také se spektrofotometrickou detekcí<sup>18</sup>. V poslední jmenované práci bylo, obdobně jako v této práci, využito poklesu absorbance fenothiazinových barviv v absorpčních maximech díky interakci s heparinem.

Spektrofotometricky byl heparin stanoven také pomocí neutrální červeně<sup>19</sup> nebo barviva Brilliant Cresyl Blue<sup>20</sup>. Stanovení pomocí těchto barviv funguje také na principu poklesu absorbance při interakci heparinu s barvivem. K fluorimetrickému stanovení bylo využito zvýšení fluorescence některých látek při interakci s heparinem, například komplex protaminu s fluoresceinem<sup>21</sup>, norfloxacinu s  $\text{Ce}^{3+}$  ionty<sup>22</sup>, danofloxacinu s  $\text{Tb}^{3+}$  ionty<sup>23</sup> nebo tetracyklinu s  $\text{Eu}^{3+}$  ionty<sup>24</sup>.

## 2.2. Fenothiazinová barviva

Tato barviva jsou odvozená od fenothiazinu, což je tricyklická aromatická sloučenina s heteroatomy síry a dusíku na prostředním kruhu<sup>25</sup> (obr. 2.3). Deriváty fenothiazinu jsou bioaktivní látky využívané jako léčiva, antioxidanty, materiály uchovávající solární energii nebo právě barviva<sup>26</sup>.



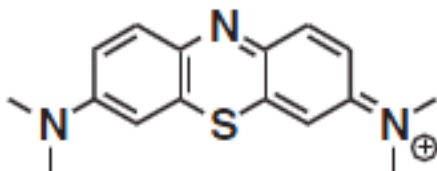
Obr. 2.3 Struktura fenothiazinu

Z derivátů odvozených od fenothiazinu jsou důležité hlavně ty, které jsou substituované buďto v poloze 2 a 10 nebo 3 a 7. Mezi fenothiaziny substituované v polohách 2 a 10 patří mnoho látek využívaných v medicíně, příkladem takové látky je chlorpromazin, který má sedativní účinky a je využíván v psychiatrii<sup>25</sup>. Jsou známé i deriváty, které mají antibakteriální, fungicidní, antivirové nebo protinádorové účinky<sup>27</sup>.

Fenothiaziny substituované v poloze 3 a 7 bývají využívány hlavně jako barviva nebo činidla v analytické chemii<sup>25</sup>. Patří mezi ně i methylenová modř, Azure A a Azure B, které byly použity ke stanovení heparinu v této práci.

### 2.2.1. Methylenová modř

Methylenová modř je pevná látka, která tvoří malé, tmavě modrozelené krystalky. Je rozpustná ve vodě a její roztok má tmavě modrou barvu. S vodou také tvoří hydráty, a to nejčastěji di nebo tri. Její molekulová hmotnost je 319,85 g/mol<sup>28</sup>. Strukturou je odvozená od fenothiazinu substituovaného v polohách 3 a 7 dvěma dimethylaminy a její systematický název tedy zní 3,7-bis(dimethylamino)fenothiazin chlorid<sup>18</sup> (obr. 2.4). Absorpční maximum methylenové modři je 664 nm.

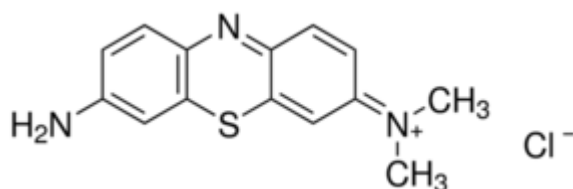


Obr. 2.4 Struktura methylenové modři

V historii byla methylenová modř využívána jako léčivo proti malárii a je také součástí barviva Giemsa, využívaného v mikrobiologii pro barvení mikroorganismů<sup>29</sup>. Pomocí barvení methylenovou modří byly také identifikovány některé důležité biomolekuly, například acetylcholin esteráza. V současnosti nachází využití v medicíně při léčbě methemoglobinemie. Je totiž enzymy přítomnými v krvi redukována na leuko-methylenovou modř, která je bezbarvá a dokáže redukovat methemoglobin zpět na hemoglobin. Dále bývá využívána jako prevence infekcí močových cest u starších lidí, nebo při léčbě septického šoku. Předmětem výzkumu v současné době je také vliv methylenové modří na zpomalení postupu Alzheimerovy choroby.

### 2.2.2. Azure A

Stejně jako methylenová modř je i azure A pevná látka, která tvoří malé krystalky<sup>30</sup>. V pevném stavu je toto barvivo tmavě zelené, rozpuštěné ve vodě potom tvoří modrý roztok. Jeho molekulová hmotnost je 291,8 g/mol a absorpční maximum má při 633 nm. Strukturou se podobá methylenové modři s tím rozdílem, že dimethylamin v poloze 3 je demethylovaný<sup>18</sup> a je zároveň jejím metabolitem<sup>29</sup> (obr. 2.5). Systematický název Azure A je 3-amino-7-dimethylaminofenothiazin chlorid<sup>18</sup>.



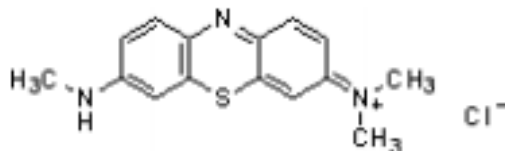
Obr. 2.5 Struktura Azure A

Vzhledem k tomu, že je Azure A metabolitem methylenové modří, jsou i jeho funkce velmi podobné<sup>31</sup>. Má také protimalarické účinky, pomáhá snižovat rozsah srdeční arytmie a bylo zkoumáno jeho využití při foto-chemoterapeutické léčbě nádorových onemocnění. Dále bylo Azure A využito například v solární energetice nebo optických senzorech.

### 2.2.3. Azure B

Azure B je také pevná látka a tvoří malé krystalky hnědozelené barvy<sup>32</sup>. V roztoku s vodou je tmavě modrá. Jeho molekulová hmotnost je 305,83 g/mol a absorpční maximum má při vlnové délce 648 nm. Stejně jako Azure A je i Azure B metabolitem methylenové modří<sup>29</sup>.

Strukturou se od ní liší tím, že v poloze 3 má aminoskupinu substituovanou pouze jedním methylem<sup>18</sup> (obr. 2.6). Systematický název Azure B je 3-methylamino-7-dimethylaminofenothiazin chlorid.



Obr. 2.6 Struktura Azure B

Azure B je také součástí barviva Giemsa, stejně jako methylenová modř a používá se k barvení mikroorganismů. Další využití má v medicíně, kde má podobné účinky jako methylenová modř, což vyplývá z toho, že je jejím metabolitem. Účinkuje tedy proti malárii a má některé protinádorové<sup>29</sup> a antivirové účinky<sup>31</sup>. Je také inhibitorem glutathion reduktasy a stejně jako u methylenové modři se zkoumá její vliv na zpomalení postupu Alzheimerovy choroby<sup>31</sup>.

#### 2.2.4. Reakce s heparinem

Spektrofotometrické stanovení heparinu pomocí fenothiazinových barviv lze uskutečnit proto, že při interakci těchto dvou látek dochází ke změně absorpčního spektra<sup>18</sup>. Absorbance barviva v maximu se sníží a zároveň se v nižších vlnových délkách vytvoří nové absorpční maximum. Rozdíl absorbance čistého barviva v hodnotě absorpčního maxima a barviva s přidaným heparinem ve stejné vlnové délce potom závisí na koncentraci přidaného heparinu, koncentraci barviva a například také na iontové síle roztoku<sup>33</sup>. Při interakci kladně nabitých fenothiazinových barviv se záporně nabitým heparinem totiž dochází díky elektrostatickým silám k dimerizaci nebo případně i trimerizaci barviva na povrchu heparinu a tím i ke změně barvy roztoku<sup>18</sup>.

## **2.3. Průtokové metody analýzy**

Při průtokových metodách analýzy je koncentrace analytu měřena v proudu kapaliny při jejím průtoku detektorem<sup>34</sup>. Tyto metody byly vynalezeny v 50. letech minulého století, kdy se začaly zvyšovat nároky na počet analýz, které musely jednotlivé laboratoře provádět. Jejich jasnou výhodou oproti vsádkovým metodám je rychlost, lepší opakovatelnost a díky menší spotřebě vzorků a činidel i nižší cena a větší ohleduplnost k životnímu prostředí.

Nejdříve byly využívány takové průtokové techniky, kde se koncentrace analytu měřila ve chvíli, kdy se ustálila rovnováha mezi ním a reagentem<sup>34</sup>. Proud činidla byl smícháván s proudem analytu tak dlouho, až byl signál detektoru maximální. Tuto metodu později nahradila metoda SFA (segmented flow analysis), kde již nedocházelo k přenášení části vzorku do dalších analýz díky oddělení jednotlivých zón vzduchovými bublinami.

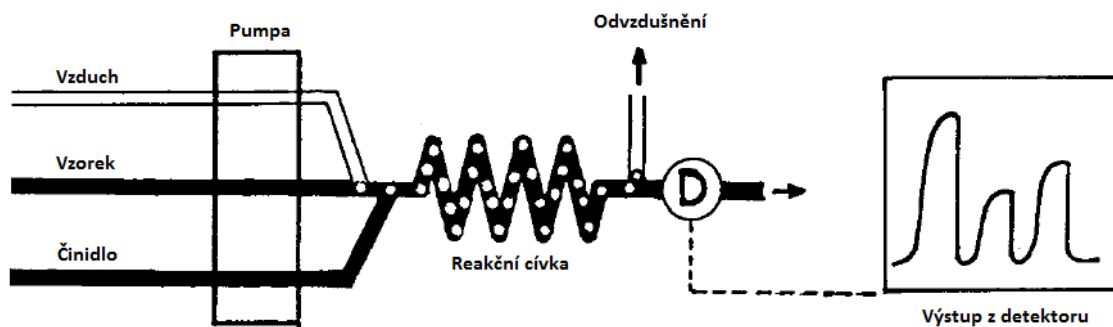
V 70. letech se k těmto technikám přidala FIA, u které již nebylo potřeba před měřením signálu čekat na ustavení rovnováhy a později, v 90. letech, také SIA<sup>34</sup>. K průtokovým metodám lze řadit ještě HPLC, u kterého před měřením k signálu dochází k separaci analytů v chromatografické koloně.

### **2.3.1. Segmentová průtoková analýza (SFA)**

Při analýze touto metodou jsou vzorky z automatického vzorkovače nejprve nasáty pomocí pumpy (v době, kdy se tato technika nejvíce používala, to byla pumpa peristaltická) a vzniklý proud kapaliny je rozdělen na segmenty přivedením vzduchu<sup>34</sup>. Do takto vytvořených segmentů se vzorkem je potom přiveden proud činidla, které s analytem přítomným ve vzorku reaguje během průchodu mísící cívkou. Vzduch je ze systému odstraněn až těsně před detektorem (Obr. 2.7). Během průchodu mísící cívkou dojde k úplnému promísení vzorku a reagentu a ustavení rovnováhy mezi nimi. Signál detektoru je potom zobrazen ve formě píku s plošinou na vrcholu.

Jednou z hlavních nevýhod SFA je pořád ještě poměrně dlouhá doba trvání analýzy<sup>34</sup>. Po spuštění přístroje trvá dlouho, než se ustálí základní linie a zároveň i při analýze je třeba čekat, než se ustálí rovnováha mezi analytem a reagentem. Dalším problémem této metody je stlačitelnost vzduchu a z toho vyplývající pulzování toku a pohyb tekutiny i chvíli po zastavení toku, což je problém hlavně u provádění analýz při zastaveném toku.



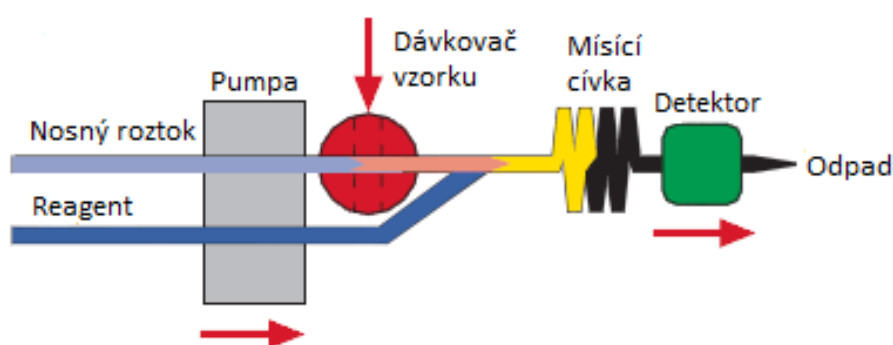


Obr. 2.7 Schéma segmentové průtokové analýzy<sup>34</sup>

### 2.3.2. Průtoková injekční analýza (FIA)

Technika FIA byla poprvé popsána Růžičkou a Hansenem v roce 1974<sup>35</sup> a od dříve používaných průtokových metod se liší hlavně nesegmentovaným tokem a tím, že detekce probíhá ve chvíli, kdy ještě není dosaženo rovnováhy mezi analytem a přidaným reagentem.

Při měření touto metodou je pomocí pumpy vytvářen v oddělených hadičkách proud reagentu nebo případně i více reagentů a proud nosného roztoku<sup>35</sup>. Tento proud má stálou rychlost a unáší pak reagenty i analyty směrem k detektoru. Do proudu nosného roztoku je pomocí injektoru nadávkován přesný objem vzorku. Proud reagentu a nosného roztoku se vzorkem jsou potom spojeny a pokračují společně skrz mísicí cívku k detektoru. V mísicí cívce se díky disperzi promísí zóny vzorku a reagentu a vzniká produkt jejich reakce, jehož koncentrace je úměrná signálu naměřeného na detektoru (Obr. 2.8).



Obr. 2.8 Schéma průtokové injekční analýzy<sup>35</sup>

Ze součástí systému FIA jsou důležité pumpy, které vytvářejí proud kapaliny o stálé průtokové rychlosti<sup>36</sup>. Nejčastěji bývají využívány pumpy peristaltické nebo pístové, přičemž nevýhodou peristaltických pump je mírné pulzování toku a pístových zase jejich omezený objem. Dále pak dávkovač vzorku, u kterého je důležitá hlavně opakovatelnost dávkovaného objemu. K dávkování vzorku se používají vícecestné (nejčastěji šesti nebo osmi) otočné ventily. Další součástí FIA je mísící cívka, kde probíhá reakce analytu a reagentu. Změnou tvaru nebo délky mísící cívky a případně ještě průtokové rychlosti a dávkovaného objemu vzorku lze ovlivnit disperzi zón analytu a reagentů při průchodu systémem a tím i tvary píků na výstupu detektoru. Všechny součásti systému FIA jsou pospojovány tenkými teflonovými hadičkami, obvykle mívají průměr 0,35 – 1,0 mm.

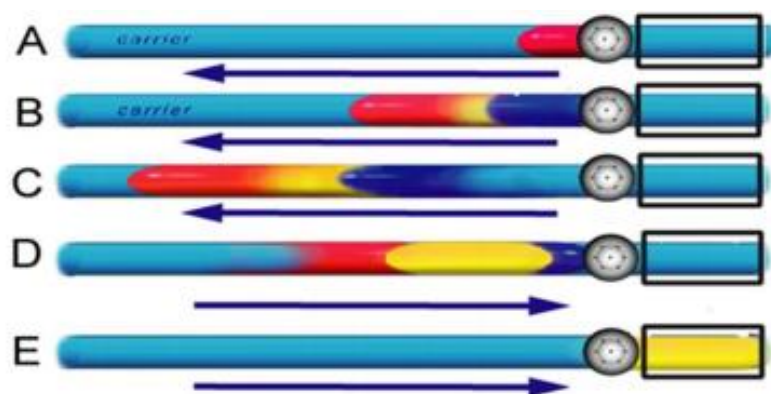
Výhodou metody FIA je hlavně její automatická, která zvyšuje přesnost a opakovatelnost analýz<sup>37</sup>. Zároveň se tím zvýší i bezpečnost práce, pracovníci laboratoře se při obsluze přístroje nedostanou do kontaktu s nebezpečnými látkami využívanými při analýze. Další výhodou je možnost miniaturizace, což snižuje potřebné množství vzorku i reagentů a tím i cenu této metody. FIA je také velice univerzální technika, která se dá využít pro různé druhy analytů a propojit s většinou známých způsobů detekce.

### **2.3.3. Sekvenční injekční analýza (SIA)**

#### **2.3.3.1. Princip a součásti systému**

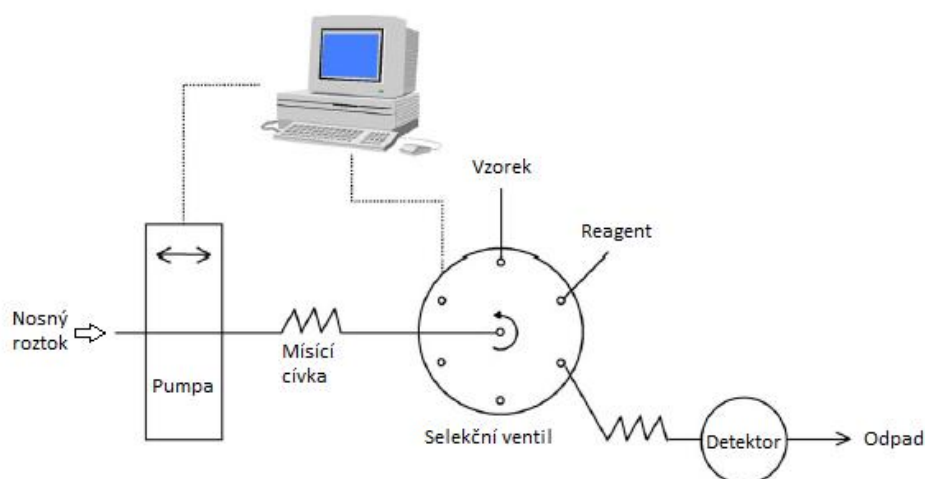
Stejně jako FIA byla i SIA vynalezena týmem J. Růžičky a jejím účelem bylo odstranění některých nedostatků metody FIA<sup>38</sup>. Poprvé byla tato technika popsána v roce 1990. SIA sice funguje na podobném principu jako FIA, ale jejich hlavní rozdíl spočívá v programovatelném směru toku a oddělených měřicích cyklech<sup>39</sup>.

Při analýze nejjednodušší verze metody SIA (obr. 2.9) je nejdříve do systému nasán přesný objem vzorku pomocí selekčního vícecestného ventilu a dvousměrné pumpy (A), poté je selekční ventil přepnut k nasátí zvoleného objemu reagentu (B)<sup>40</sup>. Vzorek i reagent se pohybují směrem k mísící cívce a začínají spolu reagovat za tvorby produktu (C). Potom je směr toku obrácen a tím se zóny vzorku a činidla ještě více promísí (D). Ve chvíli, kdy vzniklý reakční produkt doputuje k detektoru, je naměřen signál ve formě píku (E). Nakonec je celý systém promyt nosným roztokem o vysoké průtokové rychlosti.



Obr. 2.9 Princip metody SIA<sup>40</sup>

Součástí systému SIA (obr. 2.10) je jednokanálové dvousměrné čerpadlo, které tvoří definovaný tok nosného roztoku<sup>38</sup>. Používána jsou hlavně čerpadla pístová poháněná elektromotorem. Peristaltické pumpy se u SIA, na rozdíl od FIA, využívají spíše jako pomocná zařízení. Díky dvousměrné pumpě jsou také uskutečňovány změny směru toku, které pomáhají lépe promístit zóny vzorku a reagentu. U systému s jedním reagentem pak většinou stačí jedna změna toku k dostatečnému promíchání, více změn se pak využívá u mísení látek s odlišnou viskozitou. Ke zvýšení výtěžku reakce lze u systému s jedním reagentem využít spíše než více změn toku uzavření zóny vzorku mezi dvě zóny činidla.



Obr. 2.10 Schéma sekvenční injekční analýzy<sup>39</sup>

Dále je v systému SIA zařazen vícecestný selekční ventil, který slouží k seřazení zón v mísící cívce, řídí nasávání jednotlivých vzorků a reagentů a jejich následný transport k detektoru<sup>38</sup>. Přepínání tohoto ventilu je řízeno počítačem a velmi důležité je jeho správné časování a synchronizace s pohybem pumpy kvůli reprodukovatelnosti výsledků.

Mísicí cívka obvykle bývá zařazena mezi čerpadlo a selekční ventil a slouží k zadržení vzorků a reagentů, aby se nedostaly až do pumpy a zároveň k jejich promísení při obrácení směru toku<sup>38</sup>. Cívky u systému SIA bývají jednodušší a kratší než u FIA. U pomalu probíhajících reakcí je možné zařadit další cívku mezi selekční ventil a detektor. Stejně jako u FIA jsou potom všechny součásti pospojovány tenkými hadičkami.

Poslední součástí SIA systému je detektor, který slouží k měření množství produktu reakce a zaznamenává ho ve formě píku. Výška nebo plocha píku pak odpovídá koncentraci analytu ve vzorku. SIA může být propojena s mnoha variantami detektorů<sup>39</sup>. K detekci tak byly použity například detektory elektrochemické, atomové absorpční a emisní spektrometry, fluorescenční, chemiluminiscenční, infračervené a UV spektrofotometry nebo hmotnostní spektrometry. Jedním z nejčastěji používaných detektorů je spektrofotometrický ve viditelné oblasti, který je použit i v této práci.

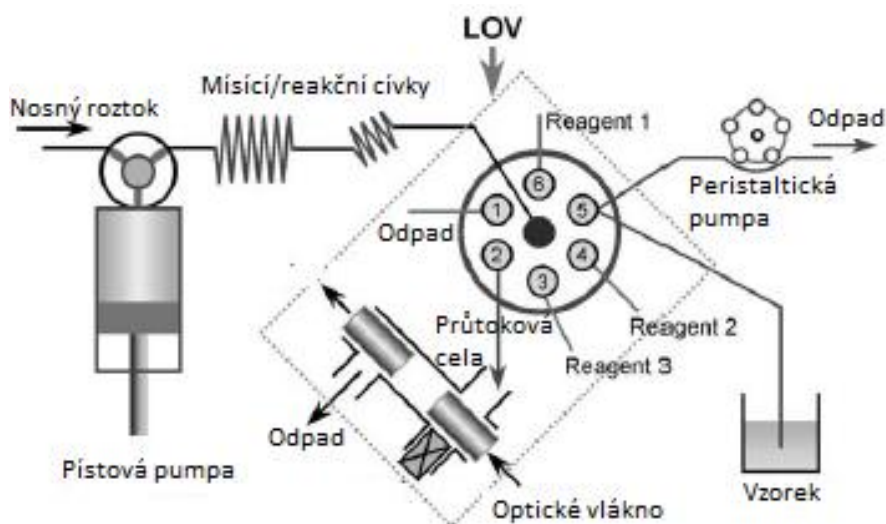
Při spektrofotometrické detekci ve viditelné oblasti se využívá reakcí, při kterých vzniká barevný produkt<sup>39</sup>. Množství tohoto produktu pak odpovídá koncentraci analytu ve vzorku a také absorbanci v dané vlnové délce naměřené na spektrofotometru. Takovou reakcí jsou například chelatace kovů, některé redoxní reakce nebo tvorba komplexů opačně nabitých látek.

### **2.3.3.2. Varianty SIA**

#### **2.3.3.2.1. SI-LOV**

SI-LOV neboli  $\mu$ SIA je miniaturizovaná varianta metody SIA, která byla vytvořena kvůli dalšímu snížení potřebných objemů vzorků a reagentů<sup>41</sup>. Zkratka LOV pochází z anglického „laboratory on valve“ tedy „laboratoř na ventilu“. Do selekčního ventilu byla totiž zabudována víceúčelová průtoková cela.

Selekční ventil je v tomto případě uspořádán tak, že do vstupu v jeho středu je připojena přes mísicí cívku pístová pumpa a je možné k ní připojit vždy jeden ze vstupů na okraji (obr. 2.11)<sup>41</sup>. Ve vstupu číslo dva je zabudována právě víceúčelová průtoková cela, která může sloužit například k ředění vzorku, inkubaci nebo, díky připojeným optickým vláknům, i k detekci. Je proto možné sledovat v reálném čase reakci, která v cele probíhá. Toto uspořádání je díky malému objemu potřebných reagentů vhodné pro enzymatické reakce nebo techniku bead injection<sup>42</sup>.



Obr. 2.11 Schéma SI-LOV metody<sup>41</sup>

#### 2.3.3.2.2. Bead injection (BI)

Tato metoda vznikla jako řešení problému se zařazením chromatografické kolony nebo SPE kolony do systému SIA nebo FIA za účelem separace nebo prekoncentrace analytů<sup>41</sup>. Tyto kolony se totiž častým používáním mohou zanášet a omezovat tak průtok nebo může dojít k porušení reaktivního povrchu sorbentu. V takovém případě je potřeba kolonu vyměnit, což je nevýhodné jak z hlediska času, tak i peněz.

Do systému SIA nebo FIA je v tomto případě přidána další průtoková cela, která slouží k zachycení malého množství suspenze kuliček sorbentu, které jsou do systému nasáty hned na počátku měřicího cyklu<sup>43</sup>. Od toho pochází i název metody „bead injection“ neboli česky „dávkování korálků“. Sorbent je zachycen v průtokové cele, odkud díky zúženému odtoku nemůže unikát. Dále je nasán vzorek, který je na sorbentu zachycen nebo separován a v případě využití BI k extrakci je v dalším kroku analyt eluován elučním roztokem. Nakonec je koncentrace analytu změřena vhodným detektorem a kuličky sorbentu jsou ze systému vypláchnuty obrácením toku. Kolona je tedy při každém měřicím cyklu obnovována a nedochází k jejímu opotřebení<sup>41</sup>.

Tuto metodu lze využít například k extrakcím pomocí afinitní chromatografie, kde jsou kuličky sorbentu pokryty protilátkou<sup>42</sup>.

### **2.3.3.3. Výhody a nevýhody SIA**

Jak už bylo řečeno na začátku, hlavní výhodou metody SIA je další zmenšení potřebných objemů vzorků i reagentů oproti FIA, což je dáno hlavně tím, že není potřeba reagenty čerpat kontinuálně a dále možnou miniaturizací do varianty SI-LOV<sup>38</sup>. Snížená spotřeba chemikálií pak nejenže snižuje cenu, ale i zvyšuje ohleduplnost k životnímu prostředí, jelikož vzniká méně odpadu.

Oproti FIA má SIA také nižší nároky na vybavení<sup>38</sup>. Je sice potřeba přesnější počítač, ale na druhou stranu kvůli jednokanálovému uspořádání stačí mít v celém systému jeden ventil a jedno čerpadlo. Další výhodou SIA je potom její variabilita. Parametry jako objemy nasávaných roztoků, průtoková rychlost nebo počet změn toku se dají snadno měnit pomocí připojeného počítače.

Nevýhodou SIA proti FIA pak je snížená frekvence dávkování vzorku a tím o něco delší doba trvání analýzy<sup>38</sup>. To je způsobeno tím, že u SIA musí nejprve proběhnout celý měřicí cyklus, než je možné nasát další vzorek, zatímco u FIA lze vzorky dávkovat poměrně rychle za sebou do kontinuálního průtoku nosného roztoku.

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Použité chemikálie

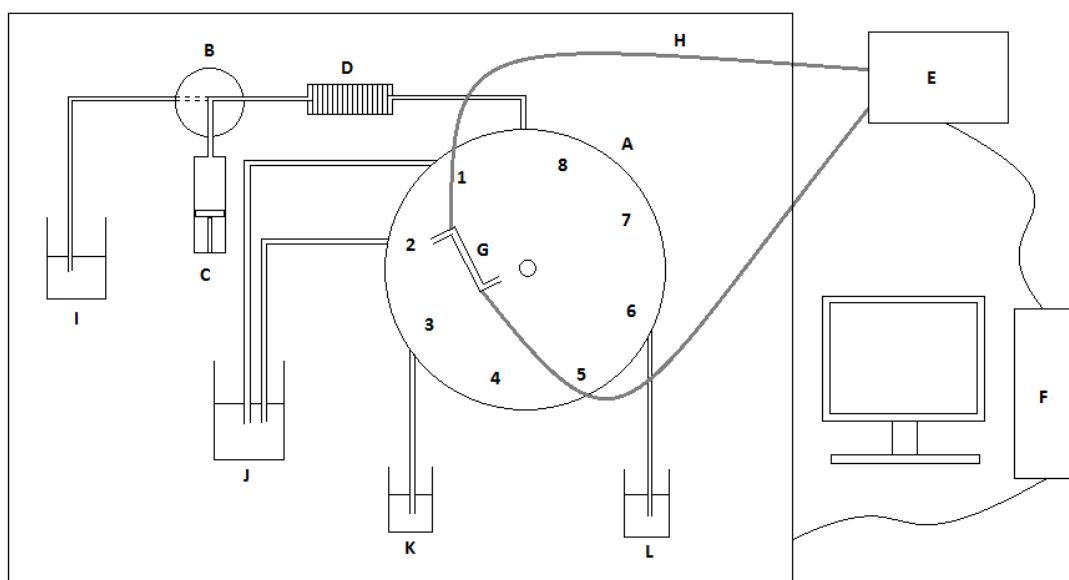
- Methylenová modř, 3,7-bis(dimethylamino)fenothiazin chlorid, čistota p.a.,  $M_r = 319,85$  (Lachema, ČR)
- Azure A, 3-amino-7-dimethylaminofenothiazin chlorid, čistota p.a.,  $M_r = 291,80$  (Sigma-Aldrich, USA)
- Azure B, 3-methylamino-7-dimethylaminofenothiazin chlorid, čistota p.a.,  $M_r = 305,83$  (LOBA chemie, Rakousko)
- Heparin sodný, injekční roztok 25000 IU/5 ml (Sandoz, Rakousko)
- Acetonitril, „Acetonitrile for HPLC“, čistota  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, USA)
- Vzorek lidské moči
- Krevní sérum lidské (Sigma-Aldrich, USA)

#### 3.2. Použité přístroje

- Spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent, USA) ovládaný počítačem s programem UV-Visible ChemStation ver. 9.01, použit na proměření absorpčních spekter
- Spektrofotometr HR 4000 (Ocean Optics, USA) se světelným zdrojem DT-MINI-2-GS propojený optickými vlákny s průtokovou celou o tloušťce 1 cm, detektor při SIA stanovení heparinu integrovaný v systému FIALab 3500
- Přístroj pro sekvenční injekční analýzu FIALab 3500 (FIALab, USA)
- Počítač vybavený programy FIALab for Windows 5.0 a SpectraSuite pro ovládání SIA aparatury a záznam a vyhodnocení dat z detektoru

### 3.3. Použitá aparatura SIA

Schéma zapojení jednotlivých součástí systému SIA je zobrazeno na obr. 3.1. Byla použita verze SI-LOV a detekce tedy probíhala v průtokové cele o délce 1 cm zabudované do selekčního ventilu, odkud byl signál přenášen optickými vlákny do spektrofotometru. K propojení všech komponent byly použity teflonové hadičky o průměrech 0,5 a 0,8 mm. Sejnou teflonovou hadičkou (0,5 mm) stočenou do spirály byla tvořena i mísící cívka. Celý systém pak byl ovládán pomocí počítače s programem FIALab for Windows 5.0.



Obr. 3.1 Schéma použité aparatury pro SIA stanovení heparinu

A – osmicestný selekční ventil; B – dvoucestný přepínací ventil; C – pístová pumpa; D – mísící cívka;  
E – spektrofotometrický detektor; F – počítač; G – průtoková cela použitá k detekci; H – optické vlákno;  
I – nosný roztok (destilovaná voda); J – odpad; K – reagent (fenothiazinové barvivo); L – vzorek (heparin)

V programu FIALab for Windows 5.0 byla vytvořena sekvence jednotlivých kroků měřicího cyklu. Nejprve byl přepnut dvoucestný ventil směrem k mísící cívce a selekční ventil do polohy dvě a pomocí pístové pumpy byl do mísící cívky nasán nastavený objem barviva. Poté byl selekční ventil přepnut do polohy šest a nasán byl zadaný objem vzorku. V případě, že bylo potřeba proměřit samotné barvivo, byla místo vzorku použita destilovaná voda. Rychlost nasávání činidla i vzorku byla u všech měření použita stejná a to 16  $\mu\text{l/s}$ . Po přepnutí dvoucestného ventilu směrem ven byl objem pístové pumpy doplněn nosným roztokem, tedy destilovanou vodou. Poté byl přepínací ventil opět přepnut směrem k mísící cívce a selekční ventil do polohy dvě a systém vyčkal dobu nastavenou



jako reakční čas. Vyprázdněním pístové pumpy nastavenou rychlostí došlo k obrácení toku a pohybu zón vzorku i činidla směrem k průtokové cele, kde byla měřena absorbance v zadané vlnové délce. Po průchodu průtokovou celou, kde bylo pomocí spektrofotometru detekováno množství vzniklého produktu reakce (rychlost snímání spektrofotometru byla u všech měření 25 ms), pokračoval veškerý obsah do odpadu. Nakonec byla pístová pumpa opět naplněna nosným roztokem a přepínací ventil přepnut k mísící cívce. Selektivní ventil zůstal v poloze dvě a celý systém byl propláchnut nosným roztokem, aby nedocházelo k přenosu vzorku do dalších analýz.

Nastavitelné parametry aparatury SIA, jejichž optimální hodnoty byly v této práci hledány, byly nasávané objemy vzorku a činidla, reakční čas a průtoková rychlost při záznamu. Všechna měření byla opakována třikrát a použita byla vždy hodnota mediánu z naměřených hodnot.

### **3.4. Zpracování dat**

Naměřená data byla nejdříve vyhodnocena pomocí programu SpectraSuite na počítači připojeném ke spektrofotometru, kde byly změřeny výšky píků. Výsledky byly poté zpracovány do tabulek a grafů v programech Microsoft Excel 2013 a Origin 8.

#### **3.4.1. Statistické vyhodnocení**

Ke statistickému zpracování naměřených dat byly použity níže uvedené metody a výpočty.

##### **3.4.1.1. Medián**

Medián je střední hodnota z na sobě nezávislých výsledků naměřených za stejných podmínek seřazených podle velikosti<sup>44</sup>. Používá se hlavně u menších souborů dat a to proto, že není příliš ovlivněn případnými většími odchylkami některých výsledků od předpokládané střední hodnoty.

V případě lichého počtu výsledků je mediánem jejich prostřední hodnota po seřazení podle velikosti<sup>44</sup>. Při sudém počtu výsledků se medián vypočte jako aritmetický průměr prostředních dvou hodnot.

#### 3.4.1.2. Aritmetický průměr

Používá se k odhadu střední hodnoty u větších souborů dat, kde by při využití mediánu mohlo dojít ke ztrátě dat z odlehlejších hodnot<sup>44</sup>. Vypočítá se jako součet všech naměřených hodnot ( $x_1 - x_n$ ) vydělený jejich počtem ( $n$ ).

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.1)$$

#### 3.4.1.3. Směrodatná odchylka

Směrodatná odchylka vyjadřuje míru přesnosti naměřených hodnot neboli jejich rozptýl okolo předpokládané střední hodnoty způsobený náhodnou chybou<sup>44</sup>. Využívá se pro větší soubory dat, kde  $n \geq 8$ , pro menší soubory dat se využívá odhad směrodatné odchylky pomocí rozpětí.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.2)$$

#### 3.4.1.4. Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka pak vyjadřuje relativní hodnotu náhodné chyby v procentech a vypočte se jako podíl směrodatné odchylky a aritmetického průměru<sup>44</sup>.

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \% \quad (3.3)$$

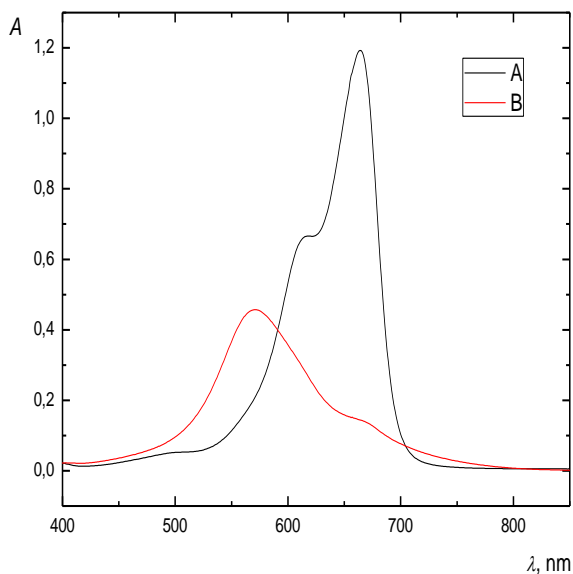
#### 3.4.1.5. Limit stanovení a limit detekce

Limit detekce je nejnižší koncentrace analytu, která je statisticky významně odlišná od šumu. Byl vypočítán jako trojnásobek směrodatné odchylky. Limit stanovení potom je nejnižší možná koncentrace, kterou lze kvantitativně vyhodnotit a byl vypočten jako desetinásobek směrodatné odchylky.

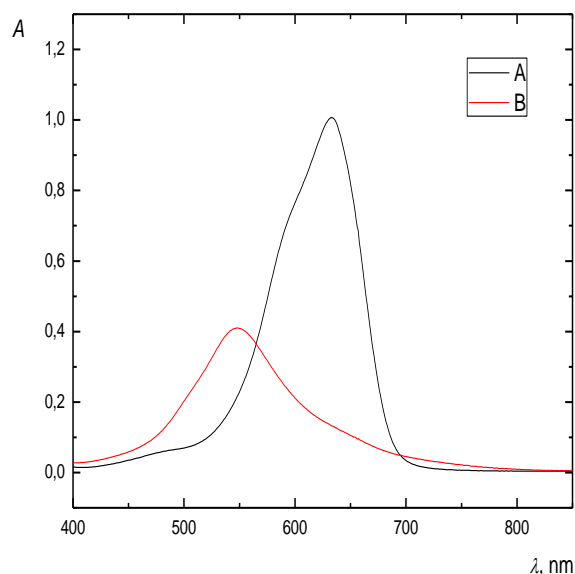
## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. Absorpční spektra fenothiazinových barviv

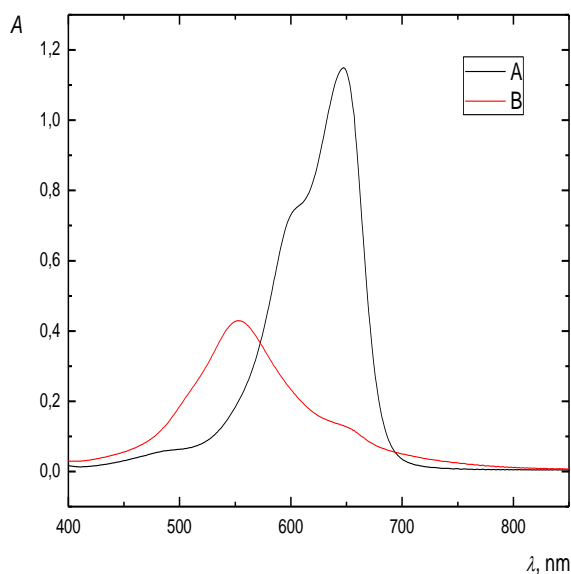
Byla proměřena absorpční spektra fenothiazinových barviv ve viditelném spektru a ve stejném rozpětí vlnových délek také spektra směsi těchto barviv s heparinem. Použita byla methylenová modř, Azure A a Azure B o koncentraci  $2,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  a heparin o koncentraci  $10 \text{ mg/dm}^3$ .



Obr. 4.1 Absorpční spektrum methylenové modři bez přídavku heparinu (A) a s heparinem (B)



Obr. 4.2 Absorpční spektrum Azure A bez přídavku heparinu (A) a s heparinem (B)



Obr. 4.3 Absorpční spektrum Azure B bez přídavku heparinu (A) a s heparinem (B)

Jak je vidět na obr. 4.1, 4.2 a 4.3 všechna použitá barviva mají ve viditelné oblasti spektra jedno absorpční maximum a to pro methylenovou modř při 664 nm, Azure A při 633 nm a Azure B při 647 nm. Po přidání heparinu došlo k poklesu absorbance v maximech a vytvořila se nová absorpční maxima v nižších vlnových délkách, a to pro methylenovou modř při 571 nm, pro Azure A při 548 nm a pro Azure B při 553 nm.

Tvary absorpčních spekter i polohy maxim absorbance odpovídají hodnotám naměřeným v pracích zabývajících se interakcemi heparinu a fenothiazinových barviv<sup>18, 33</sup>. Hodnoty absorpčních maxim barviv zároveň odpovídají tomu, co udává výrobce<sup>28, 30, 32</sup>. Pro spektrofotometrické stanovení heparinu pomocí SIA bylo využito poklesu absorbance ve vlnových délkách absorpčních maxim jednotlivých barviv při jejich interakci s heparinem (pro methylenovou modř v 664 nm, Azure A 633 nm a Azure B 647 nm).

## **4.2. Koncentrace barviv a heparinu pro další měření**

Aby bylo možné optimalizovat jednotlivé parametry SIA měření, bylo třeba nejprve určit takové koncentrace barviv a heparinu, u kterých se nejvíce projeví změny těchto parametrů.

Pomocí SIA byly změřeny nejprve absorbance samotných barviv o koncentracích 1,0; 2,0; 3,0 a 4,0 mol/dm<sup>3</sup> · 10<sup>-5</sup>. Vybrána byla pro každé barvivo taková koncentrace (tab. 4.1), jejíž absorbance se blížila hodnotě 1,000. Tato hodnota absorbance je již dostatečně vysoká, aby byly dobře patrné rozdíly způsobené změnou jednotlivých optimalizovaných parametrů, a zároveň není příliš vysoká pro spektrofotometrická měření (její absorbance se stále nachází v lineární části své kalibrační závislosti). Použité parametry přístroje byly: nasávané objemy barviv – 300 µl, průtok při měření – 25 µl/s a reakční čas – 0 s.

Dále byly při vybraných koncentracích barviv a stejných parametrech přístroje změřeny roztoky heparinu o koncentracích 2,0; 5,0; 10 a 20 mg/dm<sup>3</sup>. Pro optimalizační experimenty byla vybrána taková koncentrace heparinu (tab. 4.1), kde absorbance poklesla přibližně na 0,3. Při takové absorbanci je dostatečně velký rozdíl absorbancí samotného barviva a barviva s heparinem a projevy změn parametrů jsou tedy dobře patrné.

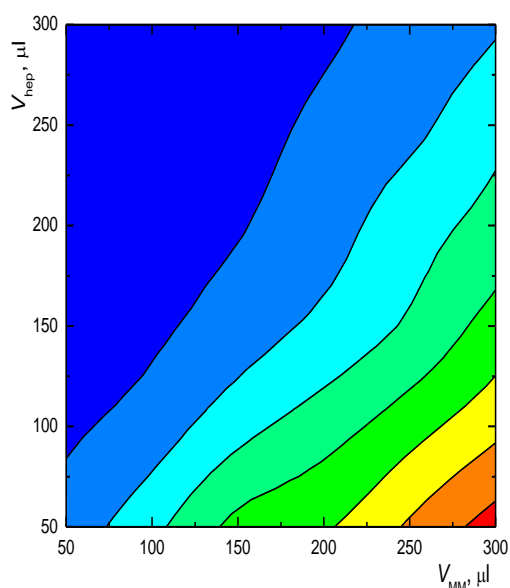
Tab. 4.1 Vybrané koncentrace jednotlivých látek pro optimalizaci dalších parametrů metody

Methylenová modř	Azure A	Azure B	Heparin (pro všechna barviva)
$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$	$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$	$4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$	$10 \text{ mg/dm}^3$

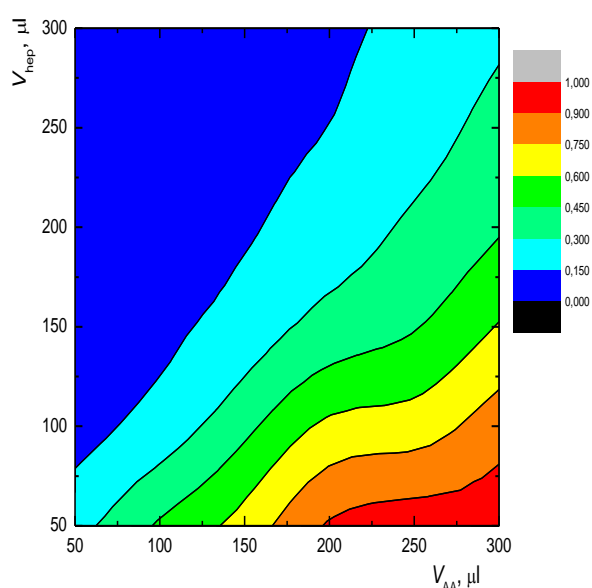
### 4.3. Poměr objemů reagentů a vzorku

K nalezení optimálních hodnot nasávaných objemů bylo provedeno měření s nasátím objemů barviva a heparinu 50, 100, 150, 200, 250 a 300  $\mu\text{l}$  ve všech možných kombinacích. Tedy 50  $\mu\text{l}$  barviva a 50  $\mu\text{l}$  heparinu, 50  $\mu\text{l}$  barviva a 100  $\mu\text{l}$  heparinu, 50  $\mu\text{l}$  barviva a 150  $\mu\text{l}$  heparinu atd. Tato měření byla provedena pro všechna tři fenothiazinová barviva o koncentracích, které byly zvoleny v předchozí kapitole. Ostatní parametry nastavení přístroje byly: průtoková rychlost při záznamu – 25  $\mu\text{l/s}$  a reakční čas – 0 s.

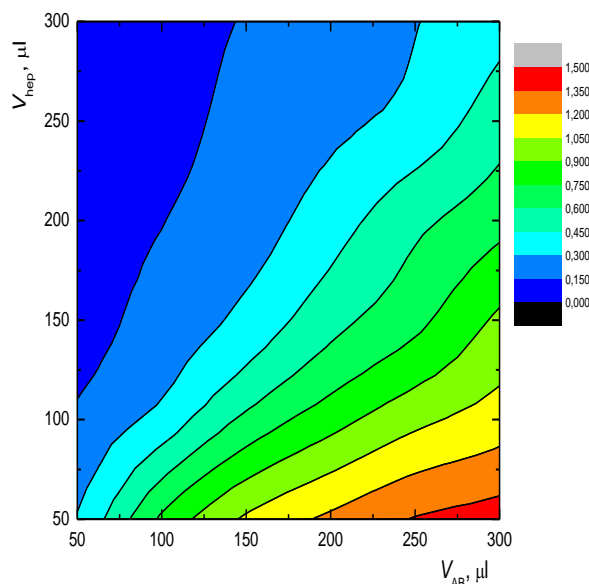
Účelem tohoto měření bylo nalézt takový poměr barviva a heparinu, kde se nejvíce projeví přítomnost heparinu změnou výšky píku. Hledán byl takový poměr nasávaných objemů, kde je pokles absorbance co nejvyšší a zároveň se změna koncentrace heparinu stále ještě může výrazně projevit (výška píků pro tento poměr se tedy nesmí blížit nule). Dalším důležitým faktorem je i spotřeba činidel a vzorků, která by měla být co nejnižší. Do grafů byla vynesena závislost výšky absorpčních píků na nasávaných objemech barviva a heparinu. Hledaná optimální hodnota tedy odpovídá co nejmenší výšce píku, která je zároveň dostatečně vzdálená od nuly.



Obr. 4.4 závislost výšky píků na poměru nasávaných objemů heparinu a methylenové modři



Obr. 4.5 závislost výšky píků na poměru nasávaných objemů heparinu a Azure A



Obr. 4.6 závislost výšky píků na poměru nasávaných objemů heparinu a Azure B

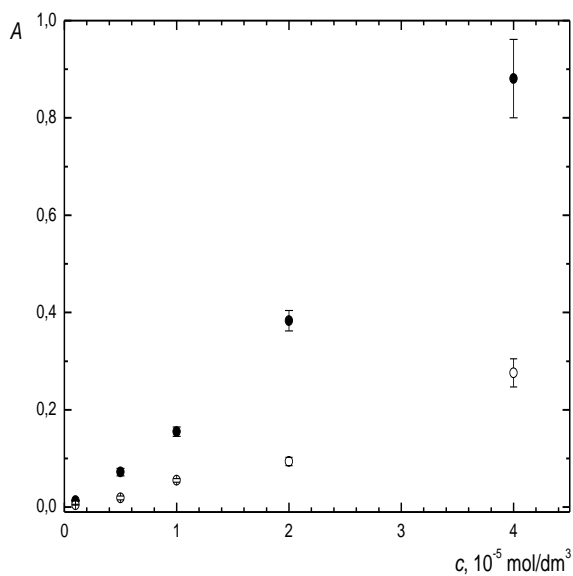
Z naměřených hodnot, zobrazených na obr. 4.4, 4.5 a 4.6 vyplývá, že optimální poměr objemů nasávaných roztoků je 1:1. Při malém nasávaném objemu heparinu a velkém objemu barviva se výšky píků blíží hodnotám naměřeným pro čisté barvivo a případné změny koncentrace heparinu by se na výškách píků neprojevíly dost výrazně. Naopak pokud je do systému nasán malý objem barviva a velký objem heparinu, nejsou píky téměř znatelné a jejich výška se blíží nule. Všechno barvivo totiž reaguje s heparinem a významnou absorbanci v jeho absorpčním maximu naměřit nelze, změny koncentrace heparinu se poté pochopitelně také nemohou projevit.

S rostoucími objemy nasávaných činidel rostla i výška absorpčních píků, což bylo nejspíš způsobeno rozmýváním zóny vzniklého produktu reakce s nosným roztokem u nižších objemů. Jako optimální nasávané objemy roztoků bylo zvoleno 150  $\mu\text{l}$  jak pro vzorek, tak pro barvivo. Tato hodnota je kompromisem mezi výškou píků, která je vyšší u vyšších hodnot a spotřebou roztoků, která by měla být naopak co nejnižší.

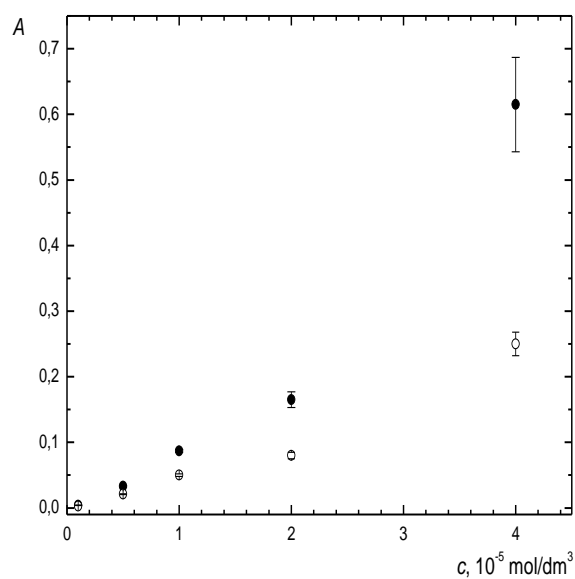
#### 4.4. Optimální koncentrace barviv

Ke zjištění optimální koncentrace barviv byla v SIA uspořádání proměřena barviva o koncentracích 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 a 4,0  $\text{mol/dm}^3 \cdot 10^{-5}$ . Nejprve bylo vždy změřeno barvivo samotné a poté produkt po reakci barviva s heparinem o koncentraci 10  $\text{mg/dm}^3$ . Protože koncentrace heparinu odpovídá rozdílu abosorbancí samotného barviva a barviva s heparinem, bylo důležité, aby tento rozdíl byl co největší. Zároveň ale signál čistého

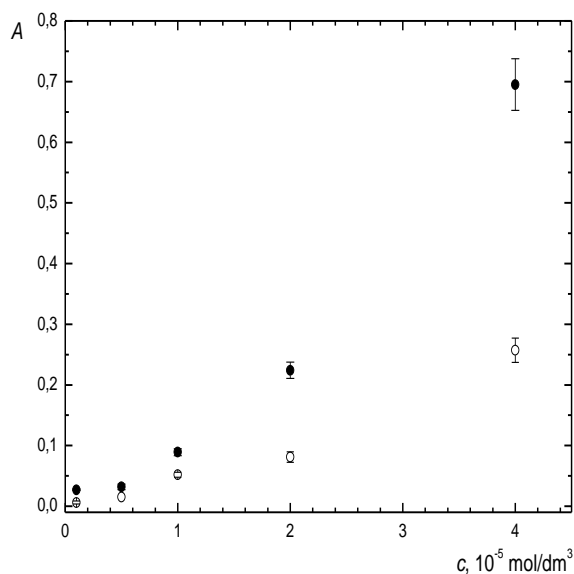
barviva nesmí být příliš vysoký, a tedy mimo oblast linearitu spektrofotometrického měření. Nasávané objemy barviv i heparinu byly 150  $\mu\text{l}$ , průtoková rychlost při měření 25  $\mu\text{l/s}$  a rekční čas 0 s.



Obr. 4.7 Závislost výšky píku bez přídavku heparinu (●) a s heparinem (○) na koncentraci methylenové modři



Obr. 4.8 Závislost výšky píku bez přídavku heparinu (●) a s heparinem (○) na koncentraci Azure A



Obr. 4.9 Závislost výšky píku bez přídavku heparinu (●) a s heparinem (○) na koncentraci Azure B

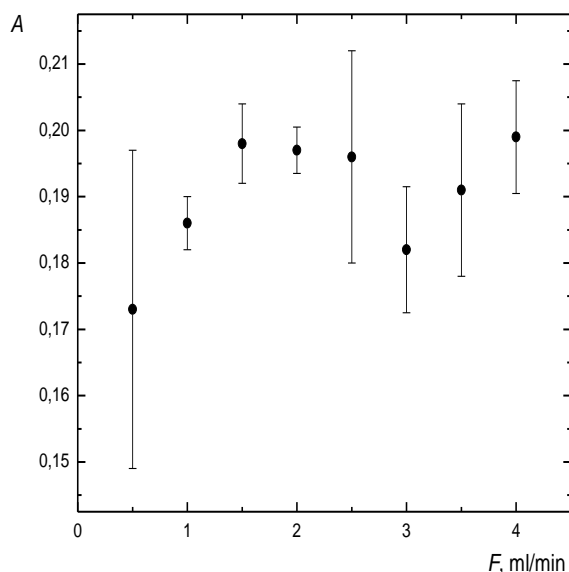
V grafech (obr. 4.7, 4.8 a 4.9) je vidět, že rozdíl absorbancí čistého barviva a barviva s heparinem se u všech barviv zvětšuje s jejich rostoucí koncentrací. Také je zde vidět, že s rostoucí absorbancí se zvětšují i chybové úsečky a měření je tedy v těchto hodnotách

méně přesné, nejspíš kvůli snižující se linearitě závislosti absorpce samotného barviva na jeho koncentraci.

Jako optimální byla tedy vybrána co nejvyšší koncentrace barviva, jejíž absorpce zároveň nepřevyšovala hodnotu 1,000. Pro methylenovou modř, jejíž absorpce byla při stejné koncentraci o něco vyšší, než u ostatních dvou barviv, byla zvolena koncentrace  $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  a pro Azure A a Azure B pak  $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ . Velmi podobných výsledků bylo dosaženo i u stanovení heparinu pomocí FIA se spektrofotometrickou detekcí<sup>18</sup>.

#### 4.5. Vliv průtokové rychlosti při záznamu na průběh stanovení

Dále byl sledován vliv průtokové rychlosti při záznamu signálu na výšku absorpčních píků. Čím vyšší je naměřený pík, tím méně dochází k rozmývání zóny barviva a heparinu, a měření tedy bude přesnější. Pro sledování vlivu tohoto parametru byla využita methylenová modř o koncentraci  $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  a heparin o koncentraci  $10 \text{ mg/dm}^3$ . Průtoková rychlost byla postupně zvyšována po 0,5 ml/min od 0,5 do 4 ml/min. Nasáváno bylo 150  $\mu\text{l}$  heparinu a barviva a reakční čas byl 0 s.



Obr. 4.10 Závislost výšky píku na průtokové rychlosti při měření

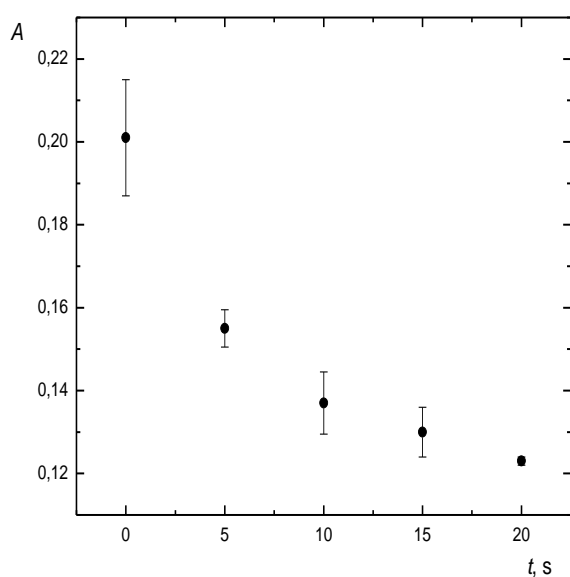
Jak je vidět na obr. 4.10, se zvyšující se průtokovou rychlostí při záznamu výška píků nejprve mírně rostla a poté zůstávala na přibližně stejné hodnotě. Při vyšších průtokových rychlostech, zřejmě kvůli vyššímu tlaku v aparatuře, navíc docházelo mnohem častěji k tomu, že se do systému dostala vzduchová bublina a analýzu bylo třeba zopakovat. Jako



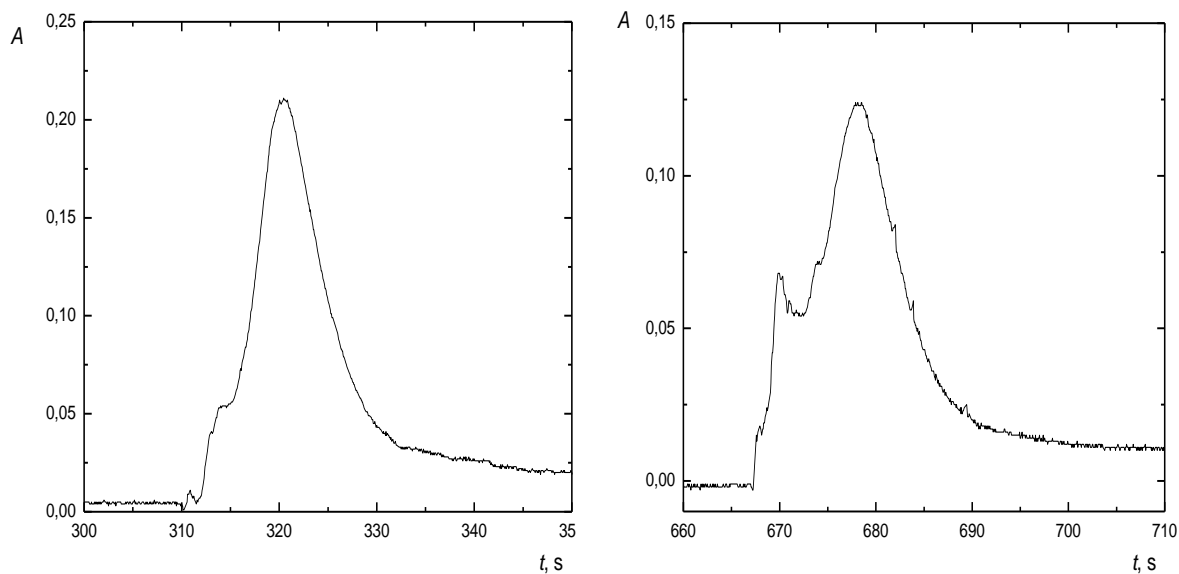
optimální průtoková rychlost byla zvolena nejnižší hodnota, která už nebyla v rostoucí části grafu, tedy 1,5 ml/min.

#### 4.6. Vliv reakčního času na tvary píků

Při sledování vlivu tohoto parametru na průběh analýzy byl reakční čas postupně zvyšován po pěti sekundách od 0 do 20 s. Ostatní parametry měření byly použity stejné jako v předchozích analýzách, tedy nasávané objemy 150  $\mu\text{l}$  a průtoková rychlost 1,5 ml/min. Reagentem byla v tomto případě methylenová modř o koncentraci  $4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$  a vzorkem heparin o koncentraci  $10 \text{ mg/dm}^3$ .



Obr. 4.11 Závislost výšky píku na reakčním čase

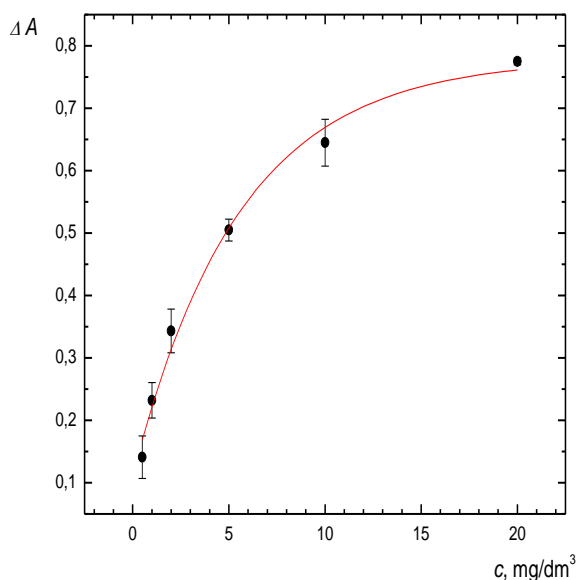


Obr. 4.12 Porovnání tvaru píků při reakčním čase 0 s (vlevo) a 20 s (vpravo)

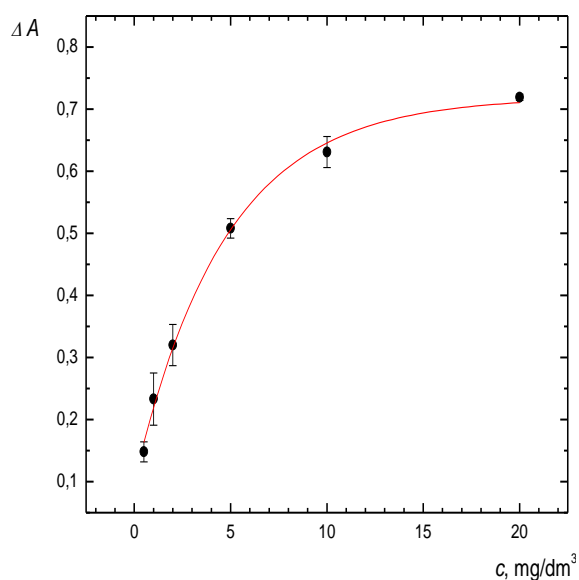
Na obr. 4.11 a 4.12 je znázorněn vliv reakčního času na tvary píků. Nejvyšší a zároveň nejužší píky byly pozorovány při nulovém reakčním čase. Čím byl reakční čas větší, tím nižší a širší byly i registrované píky. Zóna vzniklého produktu reakce tedy byla při použití delších reakčních časů více rozmytá vlivem mísení jejích okrajů s nosným roztokem a měření by v takovém případě bylo méně přesné. To odpovídá i zmínce v článku<sup>38</sup> o tom, že delší reakční časy nebo vícenásobné změny toku se v SIA analýze vyplatí pouze u pomalu probíhajících reakcí nebo při mísení kapalin o různé viskozitě. Vzhledem k tomu, že reakce fenothiazinových barviv s heparinem probíhá rychle a obě látky byly rozpuštěny v destilované vodě, způsobí delší reakční časy pouze rozmytí vzniklých píků a tedy jako optimální reakční čas bylo zvoleno 0 s.

#### 4.7. Kalibrační závislosti

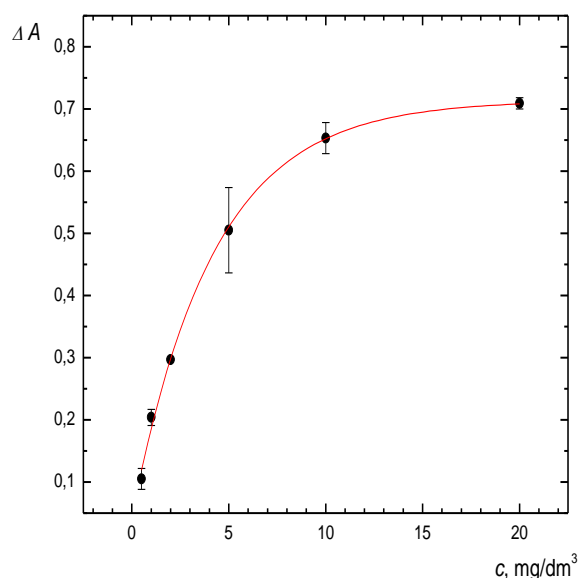
Kalibrační křivky stanovení heparinu technikou SIA byly proměřeny za podmínek, které byly výše učeny jako optimální. Průtoková rychlost při měření byla 1,5 ml/min, nasávané objemy 150  $\mu$ l a reakční čas 0 s. Nejdříve byla vždy změřena absorbance čistého barviva a poté barviva s heparinem o koncentracích 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10 a 20 mg/l. Na osu y v grafech pak byla vynesena hodnota rozdílu absorbancí čistého barviva a barviva s heparinem.



Obr. 4.13 Kalibrační křivka stanovení heparinu pomocí methylenové modři o koncentraci  $4 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>



Obr. 4.14 Kalibrační křivka stanovení heparinu pomocí Azure A o koncentraci  $5,0 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>



Obr. 4.15 Kalibrační křivka stanovení heparinu pomocí Azure B o koncentraci  $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$

V grafech (obr. 4.13, 4.14 a 4.15) je vidět, že závislost změny absorbance na koncentraci heparinu není v žádném místě lineární a body proto byly proloženy závislostí exponenciální. Rovnice této závislosti je

$$y = a \cdot e^{-\frac{x}{b}} + c \quad (4.1)$$

Parametry  $a$ ,  $b$  a  $c$  pro jednotlivá barviva jsou uvedeny v tab. 4.2. Parametr  $a$  je zároveň mírou citlivosti stanovení. Čím vyšší je absolutní hodnota tohoto parametru, tím více se projeví změna koncentrace na rozdíl absorbancí a měření tak bude citlivější. Z použitých barviv měla srovnatelnou citlivost stanovení pomocí barviv Azure B a methylenové modři a o něco nižší pomocí Azure A.

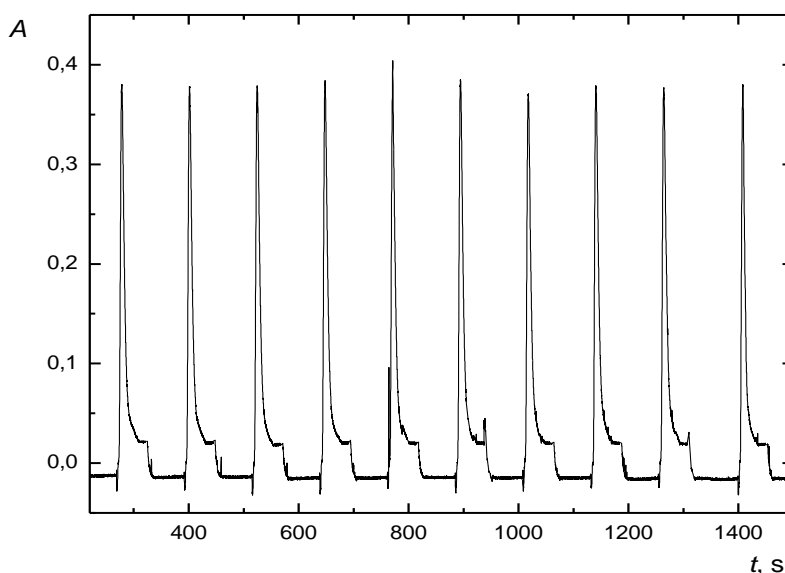
Tab. 4.2 parametry kalibračních závislostí SIA stanovení heparinu pro jednotlivá barviva

Barvivo	Parametr kalibrační rovnice ( $y = a \cdot e^{-x/b} + c$ )		
	$a$	$b$	$c$
Methylenová modř	– 0,66854	5,54996	0,77943
Azure A	– 0,61853	4,70214	0,71926
Azure B	– 0,67024	4,19181	0,71375

#### 4.8. Opakovatelnost SIA stanovení heparinu

Pro zjištění opakovatelnosti výsledků bylo u všech barviv provedeno stanovení heparinu o koncentraci  $5,0 \text{ mg/dm}^3$  desetkrát za sebou za stejných podmínek a to takových, které byly určeny jako optimální (reakční čas 0 s, nasávané objemy  $150 \text{ } \mu\text{l}$  a průtoková rychlost při měření  $1,5 \text{ ml/min}$ ). Ze změřených výšek píků byla dosazením do kalibrační rovnice vypočítána koncentrace heparinu pro jednotlivá měření a opakovatelnost SIA stanovení heparinu pak byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka těchto koncentrací (tab. 4.3).

Pro ilustraci opakovatelnosti měření je na obr. 4.13 uveden záznam píků absorbance pro deset za sebou jdoucích stanovení heparinu o jedné koncentraci pomocí methylenové modři ( $c = 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/dm}^3$ ).



Obr. 4.16 záznam píků absorbance deseti za sebou jdoucích stanovení heparinu o jedné koncentraci

Tab. 4.3 relativní směrodatné odchylky SIA stanovení heparinu pro jednotlivá barviva

Barvivo	Relativní směrodatná odchylka (%)
Methylenová modř	1,86
Azure A	2,15
Azure B	4,50

Hodnoty relativních směrodatných odchylek byly ve všech případech nízké a dá se tedy říct, že stanovení heparinu technikou SIA se spektrofotometrickou detekcí je poměrně

přesná metoda. Nejlepší opakovatelnosti bylo dosaženo u methylenové modři a nejméně opakovatelné byly naopak výsledky při použití barviva Azure B.

#### 4.9. Pracovní rozsah stanovení heparinu

Pro zjištění limitu detekce a limitu stanovitelnosti byl pro každé z barviv desetkrát za sebou stanoven heparin o koncentraci  $0,5 \text{ mg/dm}^3$  za stejných podmínek jako v předchozí kapitole. Naměřené rozdíly výšek piků byly opět pomocí kalibračních rovnic přepočítány na koncentrace a byla vypočtena směrodatná odchylka těchto koncentrací. Limit detekce byl potom vypočten jako trojnásobek směrodatné odchylky a limit stanovitelnosti jako její desetinásobek.

Spodní hranicí rozsahu koncentrací heparinu, které je možné touto metodou stanovovat, je pak právě limit stanovitelnosti a jako horní hranice bylo určeno místo na kalibračním grafu (obr. 4.13, 4.14 a 4.15; str. 34, 35), kde se zvyšující se koncentrací už rozdíl absorbancí přestává stoupat.

Tab. 4.4 limity detekce, stanovitelnosti a rozsah použitelných koncentrací SIA stanovení heparinu

barvivo	Limit detekce ( $\text{mg/dm}^3$ )	Limit stanovitelnosti ( $\text{mg/dm}^3$ )	Rozsah použitelných koncentrací ( $\text{mg/dm}^3$ )
Methylenová modř	0,09	0,30	0,30 – 15,0
Azure A	0,35	1,20	1,20 – 13,0
Azure B	0,20	0,67	0,67 – 12,0

Největší pracovní rozsah koncentrací heparinu má methylenová modř, má totiž zároveň nejnižší limity detekce a stanovitelnosti a zároveň se její kalibrační křivka nejdéle zvyšuje. Barviva Azure A a Azure B pak obě mají pracovní rozsah koncentrací heparinu podobně široký. Azure A má sice vyšší limity detekce a stanovitelnosti, ale také vyšší maximální koncentraci, která je ještě v rostoucí části kalibrační křivky. Naopak u barviva Azure B jsou všechny tyto hodnoty nižší.

Jako nejnižší detekovatelná koncentrace heparinu metodou SIA se spektrofotometrickou detekcí pomocí fenothiazinových barviv byla nalezena hodnota  $0,09 \text{ mg/dm}^3$ . Jako nejnižší stanovitelná koncentrace pak  $0,30 \text{ mg/dm}^3$  a nejvyšší  $15 \text{ mg/dm}^3$ . Všechny těchto mezních hodnot bylo dosaženo u methylenové modři.

## 4.10. Reálné vzorky

### 4.10.1. Stanovení koncentrace heparinu v moči

Závěrem práce byla pozornost věnována stanovení heparinu v reálném vzorku moči a v krevním séru. Měření probíhalo za již dříve optimalizovaných hodnot stanovení. Nejprve bylo znovu proměřeno několik bodů z kalibrační křivky stanovení heparinu pomocí methylenové modři ve vodné matrici. Jako vzorek byl použit heparin připravený o dané koncentraci v destilované vodě. Stejně jako u předchozích měření došlo k poklesu absorbance v absorpčním maximu, který byl úměrný koncentraci heparinu ve vzorku.

V dalším kroku pak byla jako vzorek použita lidská moč, do které byl přidán malý objem heparinu tak, aby jeho koncentrace ve vzorku byla  $10 \text{ mg/dm}^3$ . V tomto případě ale k poklesu absorbance vůbec nedošlo a naopak byl pozorován její nárůst o přibližně 0,2 absorbanční jednotky. Stejný nárůst absorbance byl pozorován i u vzorku moči bez přidaného heparinu. Z toho tedy jednoznačně vyplývá významný vliv tohoto typu matrice na popsané stanovení heparinu.

Byly tedy připraveny další vzorky moči s vyššími koncentracemi heparinu a to 20, 50 a  $100 \text{ mg/dm}^3$ . Ani u těchto vzorků nebyl pozorován žádný výraznější pokles absorbance, který by bylo možno přiřadit přítomnému heparinu. K mírnému poklesu došlo pouze u vzorku s  $50 \text{ mg/dm}^3$  heparinu, což ale nejspíš bylo způsobeno tím, že vzorek byl připraven z málo koncentrovaného zásobního roztoku heparinu, kterého bylo potřeba použít velký objem k dosažení požadované koncentrace, čímž byla moč naředěna a snížil se tak vliv matrice na stanovení. Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v tab. 4.5.

Zkoumanou metodu tedy bez předchozích úprav vzorku ke stanovení heparinu v moči nelze využít. Důvodem je nejspíše interference některé ze složek biologické matrice s interakcí heparinu s fenothiazinovými barvivy. Dalším problémem by mohla být vyšší iontová síla moči, jak je zmíněno v článku<sup>33</sup>. Se zvyšující se iontovou silou dochází k snížení poklesu absorbance z důvodů obklopení molekul barviva zápornými ionty, které pak brání přístupu heparinu.

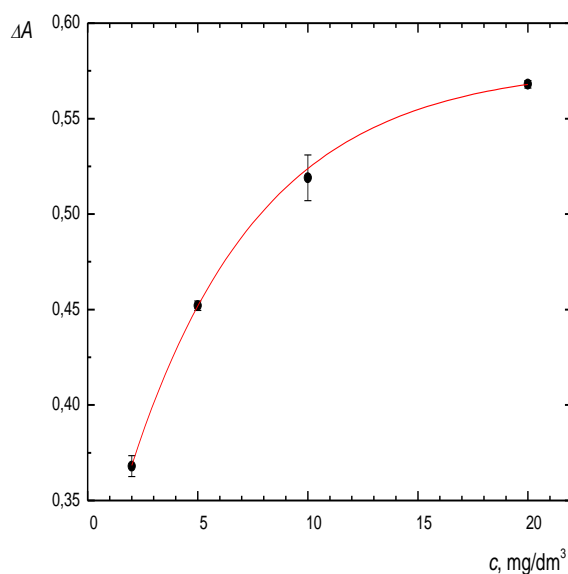
Dále byl pozorován nárůst absorbance v absorpčním maximu methylenové modři při použití vzorku moči a to jak s heparinem, tak i samotné. To mohlo být způsobeno tím, že samotná moč není úplně čirá a v této oblasti také mírně absorbuje.

Tab 4.5 Srovnání výšek píků pro různé koncentrace heparinu ve vodě a v moči

Koncentrace heparinu (mg/dm <sup>3</sup> )	Výška píku (A)	
	voda	moč
0	1,185	1,35
2	0,774	- *
10	0,406	1,41
20	0,251	1,36
50	- *	1,23
100	- *	1,32

\*Pro tyto koncentrace nebylo měření provedeno. Vyšší koncentrace heparinu ve vodě už jsou mimo pracovní rozsah koncentrací stanovitelných touto metodou. V moči naopak ani vyšší koncentrace heparinu pokles absorbance nezpůsobila a stanovovat koncentraci nižší by tedy nemělo smysl.

Aby bylo možné heparin v moči stanovit, byl následně vzorek desetkrát naředěn. Stejným způsobem jako u koncentrovaného vzorku pak byly i ze vzorku ředěného připraveny roztoky o různých koncentracích heparinu a to 2,0; 5,0; 10 a 20 mg/dm<sup>3</sup>. Po změření těchto vzorků za stejných podmínek jako u vzorků koncentrovaných byla ze získaných dat sestrojena kalibrační křivka stanovení heparinu v desetkrát naředěné lidské moči (obr. 4.17).



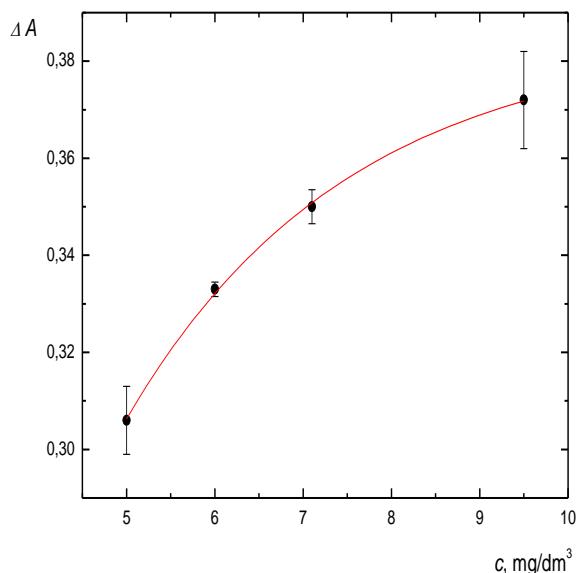
Obr. 4.17 Kalibrační křivka stanovení heparinu v desetkrát ředěné moči

Body byly stejně jako při stanovení ve vodě proloženy exponenciální závislostí (4.1) (str. 35), jejíž parametry byly  $a = -0,294$ ,  $b = 5,90673$  a  $c = 0,5779$ . Oproti stanovení ve vodě mělo stanovení v naředěné moči mnohem menší citlivost a zároveň byly menší i rozdíly absorbance vzorku bez heparinu a s ním. I po naředění vzorku tedy přetrvávaly interference způsobené matricí, i když byl jejich vliv už znatelně menší.

#### 4.10.2. Stanovení koncentrace heparinu v krevním séru

K 1,0 ml vzorku krevního séra bylo nejprve přidáno 1,0 ml acetonitrilu pro odstranění přítomných proteinů. Vzniklá sraženina byla odstraněna centrifugací. K supernatantu bylo přidáno ještě 0,5 ml roztoku heparinu o koncentraci  $100 \text{ mg/dm}^3$  a vzniklý roztok byl doplněn na celkový objem 10 ml. Výsledná koncentrace heparinu ve vzorku tedy byla  $5,0 \text{ mg/dm}^3$ . Takto připravený vzorek byl proměřen za podmínek, které byly výše určeny jako optimální.

Stejně jako u naředěného vzorku moči byl i v tomto případě pokles absorbance nižší než u stejné koncentrace heparinu ve vodě. Proto byla k sestavení kalibrační křivky stanovení heparinu v krevním séru použita metoda spikování, u které se vliv interferencí matrice zohlední. Ke vzorku tedy bylo celkem třikrát přidáno  $100 \text{ } \mu\text{l}$  roztoku heparinu o koncentraci  $100 \text{ mg/dm}^3$  a po každém přidavku byla metodou SIA změřena absorbance vzniklého reakčního produktu heparinu s barvivem.



Obr. 4.18 Kalibrační křivka stanovení heparinu v krevním séru metodou spikování



Získané body byly proloženy stejnou exponenciální závislostí (4.1) (str. 35). Parametry této závislosti byly  $a = -0,57711$ ,  $b = 2,50742$  a  $c = 0,38484$ . I u stanovení v krevním séru byl znatelný vliv interferencí matrice. Rozdíly absorbancí byly díky němu menší a stanovení tak bylo méně citlivé, než ve vodě.

## 5. Závěr

Za účelem zjištění optimálních podmínek stanovení heparinu metodou SIA se spektrofotometrickou detekcí byla nejprve proměřena absorpční spektra fenothiazinových barviv, díky jejichž interakci s heparinem lze z poklesu absorbance v jejím maximu zjistit koncentraci heparinu. Byly nalezeny vlnové délky absorpčních maxim jednotlivých barviv a to 664 nm u methylenové modři, 633 nm u Azure A a 647 nm u Azure B. Zároveň bylo ověřeno, že po přidání heparinu opravdu dochází k poklesu absorbance v těchto maximech.

Dále byly optimalizovány jednotlivé parametry nastavení přístroje. Nejvhodnějším poměrem vzorku a reagentu byl určen poměr 1:1 a jako optimální nasávaný objem bylo vybráno 150  $\mu$ l. Průtoková rychlost při záznamu byla zvolena 1,5 ml/min a reakční čas 0 s.

Byla také hledána optimální koncentrace fenothiazinových barviv. Tato koncentrace se u jednotlivých barviv lišila. Optimální koncentrací methylenové modři bylo  $4,0 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup> a Azure A i B pak shodně  $5,0 \cdot 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>.

V další části práce pak byly změřeny kalibrační křivky stanovení heparinu pomocí jednotlivých barviv. Bylo zjištěno, že závislost poklesu absorbance na koncentraci není lineární a body tak byly proloženy exponenciální závislostí. Rovnice této závislosti je  $y = a \cdot e^{-\frac{x}{b}} + c$ .

Pro porovnání vhodnosti použití jednotlivých barviv pak byla stanovena citlivost, opakovatelnost, limity detekce a pracovní rozsah pro všechna tři použitá barviva. Citlivost byla srovnatelná u všech barviv, přičemž lehce vyšší byla u methylenové modři a Azure B. Opakovatelnost byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka a u methylenové modři činila 1,86 %, u Azure A 2,15 % a u Azure B 4,50 %. Nejnižší limit detekce i stanovitelnosti byl stanoven u methylenové modři, a to 0,09 mg/dm<sup>3</sup> a 0,30 mg/dm<sup>3</sup>. Pro Azure A byl zjištěn limit detekce 0,35 mg/dm<sup>3</sup> a limit stanovitelnosti 1,2 mg/dm<sup>3</sup> a pro Azure B byly hodnoty těchto parametrů 0,20 a 0,67 mg/dm<sup>3</sup>. Nejvyšší krajní hodnota (15 mg/dm<sup>3</sup>) pracovního rozsahu použitelnosti této metody byla také zjištěna u methylenové modři. Pomocí Azure A pak lze spolehlivě stanovit heparin až do koncentrace 13 mg/dm<sup>3</sup> a pomocí Azure B do 12 mg/dm<sup>3</sup>.

Všechna barviva měla testované charakteristiky srovnatelné, nicméně ve všech případech byly vykazovány nejlepší hodnoty při použití methylenové modři a byla tak vyhodnocena jak nejvýhodnější barvivo pro stanovení heparinu metodou SIA se spektrofotometrickou detekcí ze tří testovaných barviv.

Na závěr práce pak byly za podmínek, které byly určeny jako optimální, stanoveny koncentrace heparinu v reálných vzorcích lidské moči a krevního séra. U obou vzorků se projevily interference matrice snížením rozdílového signálu. Koncentrovaný vzorek moči bylo potřeba naředit, aby k poklesu absorbance způsobenému heparinem vůbec došlo.

## Použitá literatura:

1. Capila, I.; Linhardt, R. J.: Heparin – Protein Interactions. *Angewandte Chemie International Edition* 41, 390-412 (2002)
2. Day, J. R. S.; Landis, R.C.; Taylor, K. M.: Heparin is much more than just an anticoagulant. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 18:1, 93-100 (2004)
3. Olson, S. T.; Richard, B.; Izaguirre, G.; Shedin-Weiss, S.; Gettins, P. G. W.: Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. *Biochimie* 92, 1587-1596 (2010)
4. Hirsh, J.; Warkentin, T. E.; Raschke, R.; Granger, Ch.; Ohman, E. M.; Dalen, J. E.: Heparin and Low-Molecular Weight Heparin: Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing Considerations, Monitoring, Efficacy, and Safety. *CHEST* 114:5, 489-510 (1998)
5. Liao, G. Q.; Li, H. W.; Luo, L. G.: Determination of Heparin in Plasma by HPLC Coupled with Resonance Light Scattering Detection. *Chromatographia* 76, 1677-1682 (2013)
6. Haselbach, S.; Maurer, J.; Vogel, V.; Harder, S.; Weber, Ch. F.; Baykut, D.; Meininger, D.; Keller, H.; Moritz, A.; Mäntele, W.: A novel method for the direct determination of heparin concentration during cardiopulmonary bypass surgery. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51:10, 2037-2043 (2013)
7. Ramamurthy, N.; Baliga, N.; Wahr, J. A.; Schaller, U.; Yang, V. C.; Meyerhoff, M. E.: Improved protamine-sensitive membrane electrode for monitoring heparin concentrations in whole blood via protamine titration. *Clinical Chemistry* 44:3, 606-613 (1998)
8. Tůma, P.; Samcová, E.; Opekar, F.; Štulík, K.: Determination of intact heparin by capillary electrophoresis with contactless conductivity detector in background electrolytes containing hydrophilic polymers. *Collection of Czechoslovak Chemical Communication* 73:2, 187-200 (2008)
9. Kapke, G. F.; Feld, R. D.; Witte, D. L.; Oven, W. G.: Esterolytic Method for Determination of Heparin in Plasma. *Clinical Chemistry* 27:4, 526-529 (1981)
10. Toyoda, H.; Nagashima, T.; Hirata, R.; Toida, T.; Imanar T.: Sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the determination of heparin and heparan sulfate in biological samples: application to human urinary heparan sulfate. *Journal of Chromatography B* 704, 19–24 (1997)
11. Patel, R. P.; Narkowicz, Ch.; Hutchinson, J. P.; Hilder, E. F.; Jacobson, G. A.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46, 30-35 (2008)
12. Zhou, X.; Liu, J.; Zhang, M.; Chen, S.: Determination of plasma heparin by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Talanta* 46, 757–760 (1998)
13. Niu, X.; Zhang, W.; Zhao, N.; Sun, W.: Voltametric determination of heparin based on its interaction with malachite green. *Bulletin of Chemical Society of Ethiopia* 22:2, 165-172 (2008)
14. Tan, L.; Yao, S.; Xie Q.: Electrochemical determination of heparin using methylene blue probe and study on competition of Ba<sup>2+</sup> with methylene blue for binding heparin. *Talanta* 71, 827-832 (2007)

15. Cheng, T.; Lin, T.; Wu, T.; Chang, H.: Determination of heparin levels in blood with activated partial thromboplastin time by a piezoelectric quartz crystal sensor. *Analytica Chimica Acta* 432, 101-111 (2001)
16. Lewinski, K.; Hu, Y.; Griffin, Ch. C.; Cox, J. A.: Electrochemical Oxidation and Determination of Heparin at Electrodes Modified with Ruthenium Oxide or Copper Oxide. *Electroanalysis* 9:9, 675-679 (1997)
17. Huang, Ch. Z.; Pang, X. B.; Li, Y. F.: Determination of Heparin Using Azure B by Flow Injection Analysis-Resonance Light Scattering Coupled Technique. *Analytical Letters* 38, 317-330 (2005)
18. Němcová, I.; Rychlovský, P.; Havelcová, M.; Brabcová, M.: Determination of heparin using flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta* 401, 223-228 (1999)
19. Sun, W.; Ding, Y. Q.; Rao, J.; Jiao, K.: Spectrophotometric determination of heparin with neutral red. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* 26:7, 1322-1325 (2006) CA 2006:882467
20. Sun, W.; Jiao, K.; Niu, X. L.; Lu, L. D.: Fading spectrophotometric determination of heparin with brilliant cresyl blue. *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* 25:8, 1322-1324 (2005) CA 2005:1031504
21. Egawa, Y.; Hayashida, R.; Seki, T.; Anzai, J.: Fluorometric determination of heparin based on self-quenching of fluorescein-labeled protamine. *Talanta* 76, 736-741 (2008)
22. Patil, S. R.; Mote, U. S.; Patil, S. R.; Kolekar, G. B.: Determination of Heparin Using Norfloxacin-cerium Complex as a Fluorescence Probe by Spectrofluorimetry. *Bulletin of The Korean Chemical Society* 30:12, 3034-3038 (2009)
23. Manzoori, J. L.; Jouyban, A.; Amjadi, M.; Ramezani, A. M.: Determination of heparin using terbium-danofloxacin as a luminescent probe. *Journal of Applied Spectroscopy* 80:1, 104-110 (2013)
24. Zhu, X.; Wang, X.; Jiang, Ch.: Spectrofluorimetric determination of heparin using a tetracycline-europium probe. *Analytical Biochemistry* 341, 299-307 (2005)
25. Karpińska, J.; Starczewska, B.; Puzanowska-Tarasiewicz, H.: Analytical Properties of 2- and 10-Disubstituted Phenothiazine Derivates. *Analytical Sciences* 12, 161-170 (1996)
26. Li, X. S.; Liu, L.; Mu, T.; Guo, Q.; Liu, Y.: A theoretical study on the structure and properties of phenothiazine derivates and their radical cations. *Research on Chemical Intermediates* 26:4, 375-384 (2000)
27. Pluta, K.; Morak-Młodawska, B.; Jeleń, M.: Recent progress in biological activities of synthesized phenothiazines. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 3179-3189 (2011)
28. Pentachemicals: bezpečnostní listy, methylenová modř hydrát. Dostupné z URL:  
< [http://www.pentachemicals.eu/bezp\\_listy/m/bezplist\\_294.pdf](http://www.pentachemicals.eu/bezp_listy/m/bezplist_294.pdf) > [cit. 19.4.2014]
29. Schirmer, R. H.; Adler, H.; Pickhardt, M.; Mandelkow, E.: "Lest we forget you – methylene blue..." *Neurobiology of Aging* 32, 2325.e7-2325.e16 (2011)
30. Sigmaaldrich: popis produktu, Azure A chloride. Dostupné z URL:  
< <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/861049?lang=en&region=CZ> > [cit. 20.4.2014]

31. Puja, P.; Gopinatha, S. K.: Thermodynamics of the DNA binding of phenothiazinium dyes toluidine blue O, Azure A and Azure B. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 64, 50-57 (2013)
32. Sigmaaldrich: popis produktu, Azure B. Dostupné z URL:  
< <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a4043?lang=en&region=CZ> >  
[cit. 20.4.2014]
33. Jiao, Q.; Liu, Q.: Characterization of the interaction between methylene blue and glycosaminoglycans. *Spectrochimica Acta Part A* 55, 1667-1673 (1999)
34. Masoom, M.; Townshend, A.: Flow Injection Analysis – A Superior Alternative to Air-Segmented Continuous Flow Analysis. *Journal of The Chemical Society of Pakistan* 10:2, 269-282 (1988)
35. Růžicka, J.; Hansen, E. H.: Peer Reviewed: Flow Injection Analysis: From Beaker to Microfluidics. *Analytical chemistry* 72:5, 212A-217A (2000)
36. Koleva, B. D.; Ivanova, E. H.: Flow injection analysis coupled with atomic spectrometry. *Bulgarinan Chemical Communications* 41:1, 3-11 (2009)
37. Idris, M. A.: Flow Injection, Overlooked Techniques in Forensic Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 40, 218-225 (2010)
38. Paseková, H.; Polášek, M.; Solich, P.: Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy* 93:6, 354-359 (1999)
39. Pimenta, A. M.; Montenegro, M. C. B.; Araújo, A. N.; Calatayud, J. M.: Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40, 16-34 (2006)
40. FIALab Instruments: principy metod, sekvenční injekční analýza. Dostupné z URL:  
< [http://www.flowinjection.com/images/Sequential\\_Injection.pdf](http://www.flowinjection.com/images/Sequential_Injection.pdf) > [cit. 27.4.2014]
41. Wang, J.; Hansen, E. H.: Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 22:4, 225-231 (2003)
42. Mesquita, R. B. R.; Rangel, A. O. S. S.: A review on sequential injection methods for water analysis. *Analytica Chimica Acta* 648, 7-22 (2009)
43. FIALab Instruments: principy metod, bead injection. Dostupné z URL:  
< [http://www.flowinjection.com/images/Bead\\_Injection.pdf](http://www.flowinjection.com/images/Bead_Injection.pdf) > [cit. 28.4.2014]
44. Eckschlager, K.: *Chemometrie I*. 2. vydání, Praha, Reprodukční a knihařské pracoviště PřF UK Praha 1994